

# Die Expression von Smad5 und der alternativen Splicingform Smad5 $\beta$ bei Akuter Myeloischer Leukämie

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Jan Waskowski**  
geboren am 21. Juni 1979 in Gera

**Gutachter**

- 1. Prof. Dr. Klaus Höffken, Jena**
- 2. PD Dr. Ulrich Wedding, Jena**
- 3. Prof. Dr. Stefan Wölfl, Heidelberg**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 07. Juli 2009**

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALK	Activin receptor-like kinase, Rezeptor der TGF $\beta$ -Superfamilie
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
BMP	Knochenmorphogenesefaktoren
CD	Cluster of Differentiation
CDK	Cyclin-abhängige Kinasen
CFU-GM	Colony-forming unit granulocyte-macrophage, bipotente hämatologische Stammzellen
cKIT	Stammzellfaktor-Rezeptor, CD 117
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
cMPL	Thrombopoietin-Rezeptor
C <sub>t</sub>	Threshold-Cycle, Zyklus in dem die Fluoreszenz einer Probe die Hintergrundfluoreszenz überschreitet
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
FAB	French-American-British-Klassifikation, u.a. für die AML bestehend
FACS	Fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FCS	fetales Kälberserum
Gpt	Gigapartikel
Gran	Neutrophile Granulozyten
IL	Interleukin
Lin <sup>-</sup>	Linienmarker-negativ
MNC	Mononukleäre Zellen
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MH	Mad-homologe-Domäne
MPD	Myeloproliferative Erkrankung
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NLS	Nuclear Localization Signal
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SBE	Smad-bindendes Element der DNA

## Abkürzungsverzeichnis

SCF	Stammzellfaktor
SF	serumfrei
Smurf	Smad ubiquitination regulatory factor
Tab.	Tabelle
T $\beta$ R	TGF $\beta$ -Rezeptor
TGF $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$
TPO	Thrombopoietin
WHO	'World Health Organisation'

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Inhaltsverzeichnis	3
Zusammenfassung	6
1. Einleitung	8
1.1 Die TGF $\beta$ -Superfamilie	8
1.1.1 Funktion der Knochenmorphogenesefaktoren speziell des BMP4 in der Hämatopoese	8
1.1.2 Funktion der Transformierenden Wachstumsfaktoren $\beta$ (TGF $\beta$ ) in der Hämatopoese	9
1.2 Die TGF $\beta$ / BMP-Signaltransduktion	11
1.2.1 Der Rezeptor	11
1.2.2. Signalübertragung via Smad-Molekülen	11
1.2.3 Mechanismen der Negativregulation	14
1.3 Smad5 und die alternative Spleißvariante Smad5 $\beta$	14
1.3.1 Smad5 und seine Bedeutung für die Hämatopoese	14
1.3.2 Smad5 $\beta$	17
1.4. Akute myeloische Leukämie	18
1.4.1 Epidemiologie	18
1.4.2 Ätiologie und Pathogenese	19
1.4.3 Klassifikation	20
1.4.4 Prognose	22
2. Ziele der Arbeit	23
3. Material und Methoden	24
3.1 Material	24
3.1.1 Patientenmaterial	24
3.1.2 Zelllinien	25
3.2 Methoden	26
3.2.1 Isolierung von Leukozyten	26
3.2.2 Auftrennung der Zellfraktionen aus dem peripheren Blut	26
3.2.2.1 Auftrennung mit MicroBeads	26
3.2.2.1.1 Magnetische Markierung	26
3.2.2.1.2 Magnetische Zellseparation	27
3.2.2.2 Dichtegradientenauftrennung	28

## Inhaltsverzeichnis

3.2.3	Zellkultur	28
3.2.4	RNA-Isolierung	29
3.2.5	cDNA-Synthese	30
3.2.6	RT-PCR	30
3.2.7	Gelelektrophorese	31
3.2.8	Real-Time-PCR	32
3.2.8.1	Herstellung von Standards	32
3.2.8.1.1	Aufreinigung von PCR-Produkten aus einem Agarosegel	32
3.2.8.1.2	Einklonierung der DNA-Fragmente	33
3.2.8.1.3	Gewinnung der Plasmid-DNA	34
3.2.8.1.4	Restriktionsverdau	34
3.2.8.2	Durchführung der Real-Time-PCR	35
3.2.9	Statistische Methoden	38
4.	Ergebnisse	39
4.1	Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$ in Zelllinien hämatologischer Erkrankungen	39
4.1.1	Expression unter nativen Kulturbedingungen	39
4.1.2	Untersuchung der Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$ in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen bei drei ausgewählten Zelllinien	41
4.1.2.1	MOLM 13	42
4.1.2.2	Hel	42
4.1.2.3	U937	45
4.2	Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$ in den Leukozyten aus dem peripheren Blut gesunder Probanden	45
4.2.1	Expression in frisch bis zur mRNA aufgearbeiteten Leukozytenproben aus dem peripheren Blut gesunder Probanden	45
4.2.2	Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$ in bei -80 °C gelagerten Leukozytenproben aus dem peripheren Blut gesunder Probanden	46
4.2.3	Vergleich der Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$ in bei -80 °C gelagerten Leukozytenproben und frisch bis zur RNA-Ebene aufgearbeiteten Leukozyten aus dem peripheren Blut gesunder Probanden	47
4.2.4	Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$ in einzelnen Leukozytenfraktionen des peripheren Blutes gesunder Probanden	49
4.4	Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$ im peripheren Blut von an AML erkrankten Patienten	52

## Inhaltsverzeichnis

4.5	Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$ in Knochenmarksproben von an AML erkrankten Patienten	58
4.5.1	Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$ in eingefrorenen Knochenmarksproben von an AML erkrankten Patienten bei Diagnosestellung	58
4.5.2	Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$ in frisch aufgearbeiteten Knochenmarksproben von an AML erkrankten Patienten bei Diagnosestellung	60
5.	Diskussion	69
6.	Schlussfolgerung	80
	Literaturverzeichnis	81
	Anhang	89

## **Zusammenfassung**

Eine wichtige Rolle bei der Hämatopoese haben Vertreter der TGF $\beta$ -Superfamilie, zum Beispiel die Transformierenden Wachstumsfaktoren  $\beta$  und das BMP4. Deren Signale werden durch Smad-abhängige und Smad-unabhängige Wege übermittelt. Für Smad5 wird sowohl eine Funktion im BMP- als auch im TGF $\beta$ -Signalweg diskutiert (Bruno et al. 1998, Chang et al. 1999, Li et al. 2001, Liu et al. 2003, Hariharan und Pillai 2006). Smad5 wird als Signalübertragungsmolekül sowohl bei der embryonalen als auch bei der adulten Hämatopoese und insbesondere der Erythropoese Bedeutung zugeschrieben (Bruno et al. 1998, Yang et al. 1999, Fuchs et al. 2002, Liu et al. 2003, Lenox et al. 2005), wobei der Einfluss von Smad5 anhand aktueller Ergebnisse kontrovers diskutiert wird (Singbrant et al. 2006). Auch ist die Kontrolle der Smad5-vermittelten Signalübertragung noch nicht genau verstanden, wurde doch ein gegensinniges Transkript, genannt DMAS, beschrieben (Zavadil et al. 1999). Jiang und Mitarbeiter (2000) wiesen darüber hinaus eine alternative Spleißvariante des Smad5, das Smad5 $\beta$  nach. Dieses Transkript kodiert eine verkürzte Proteinvariante und wurde in verschiedenen Tumorzellen, in Zellen des peripheren Blutes sowie in CD34<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen. Es bildet weder mit Smad5 noch mit Smad4 Oligomere (Jiang et al. 2000). Fuchs und Kollegen konnten diese mRNA-Variante in ihrer Arbeit zwar nachweisen, fanden aber keine schlüssigen Expressionsmuster vor (Fuchs et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit sollte nun die Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  in unterschiedlichen Proben bestimmt werden. Bei Patientenproben wurde der Zusammenhang zwischen der Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  mit klinischen Parametern geprüft. Wir erhofften uns daraus ein weitergehendes Verständnis der Smad5 $\beta$ -Expression und damit Hinweise auf dessen Funktion.

Für die Arbeit wurden nach Etablierung geeigneter Standards mittels RT-PCR die qualitative und mittels Real-Time-PCR die quantitative Expression von Smad5 und seiner Spleißvariante Smad5 $\beta$  an verschiedenen Leukämie- und Lymphomzelllinien sowie in Zellen des peripheren Blutes gesunder Probanden untersucht. Dabei wurden auch Leukozyten-Subpopulationen betrachtet. Darüber hinaus erfolgten Expressionsstudien am peripheren Blut und am Knochenmark an AML erkrankter Patienten, für die ein statistischer Zusammenhang mit relevanten klinischen Parametern geprüft wurde.



Es konnte gezeigt werden, dass die alternative Spleißvariante des Smad5 Smad5 $\beta$  nicht nur in verschiedenen Tumorzelllinien, sondern auch durchgehend in Zellen des Knochenmarkes und des peripheren Blutes nachweisbar ist. Mit Ausnahme einiger Zelllinien und der mononukleären Zellen des peripheren Blutes gesunder Probanden wird das alternative Transkript konstant stärker exprimiert als Smad5, insbesondere in der granulozytären Reihe. Für die Zelllinie MOLM13 konnte ein statistisch gesicherter Zusammenhang der Expression von Smad5 und seiner Spleißvariante in Abhängigkeit von der Zeit und dem Serumgehalt der Kultur gezeigt werden. Unterschiede in der Expression besonders von Smad5 im Blut gesunder Probanden beruhen auf unterschiedlicher Probenbehandlung im Vorfeld, wobei insbesondere die Zeit bis zum Konservieren der Probe einen entscheidenden Einfluss ausüben kann. In den Patientenproben aus dem peripheren Blut fallen Unterschiede in Abhängigkeit von der Herkunft der Proben auf, die wahrscheinlich durch die unterschiedlichen bereits begonnenen Therapieregime bedingt sind. Des Weiteren wird Smad5 statistisch signifikant und Smad5 $\beta$  numerisch in Abhängigkeit von der Leukozytenzahl geringer exprimiert, wobei direkte Bezüge zur Blastenzahl der Probe nicht hergestellt werden können. Auch besteht eine statistisch relevante Abhängigkeit von der prognostisch bedeutsamen Altersgrenze 60. Lebensjahr, wobei Smad5 $\beta$  bei jüngeren Patienten stärker exprimiert wird. Dieser Zusammenhang konnte auch in den Untersuchungen am Knochenmark gezeigt werden. Beziehungen zu den in der Altersgruppe der über 60-jährigen vermehrt auftretenden zytogenetischen Veränderungen, wie der (teilweise) Verlust der Chromosomen 5 und 7 oder komplex-chromosomale Abberationen (Kern et al. 2003), sind denkbar. Ebenso konnte im Knochenmark gezeigt werden, dass an AML erkrankte Patienten im Unterschied zu zwei Kontrollgruppen (AML-Patienten in immunzytologischer kompletter Remission bzw. nicht an AML erkrankte Patienten mit immunzytochemischen Normalbefund) eine stärkere Expression an Smad5 als auch an Smad5 $\beta$  aufweisen. Dabei sind die Unterschiede besonders auf Proben mit hoher Blastenlast zurückzuführen.

Weitergehende Untersuchungen sollten den Proteinnachweis erbringen, die quantitative Expression in CD34<sup>+</sup>-Zellen gesunder und an AML-erkrankter Probanden untersuchen und über die Anti-Sense-Technologie Rückschlüsse auf die Funktion liefern.

## 1. Einleitung

Die Hämatopoese ist ein fein regulierter Ablauf von Differenzierung, Proliferation und Zelltod, ausgehend von einer relativ gesehen kleinen Anzahl multipotenter Stammzellen. Ihre Regulation erfolgt in einer konzertierten Aktion von Hormonen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen.

### 1.1 Die TGF $\beta$ -Superfamilie

Einen wichtigen Einfluss auf die Hämatopoese haben die Vertreter der TGF $\beta$ -Superfamilie. Ihr gehören über 35 strukturell eng verwandte Proteine an, die den Transformierenden Wachstumsfaktoren  $\beta$  (TGF $\beta$ ), den Aktivinen und Inhibinen oder den Knochenmorphogenesefaktoren (BMP) zu zurechnen sind (ten Dijke und Hill 2004).

#### 1.1.1 Funktion der Knochenmorphogenesefaktoren speziell des BMP4 in der Hämatopoese

Die Knochenmorphogenesefaktoren (BMP) wurden ursprünglich entdeckt und beschrieben aufgrund und mit ihrer Fähigkeit zu Induktion, Regeneration und Reparatur von Knochen. Inzwischen sind ca. 20 BMPs entdeckt, die neben der Potenz die Knochenbildung zu beeinflussen, Funktionen in vielen verschiedenen embryonalen und adulten Geweben übernehmen. Verlust der entsprechenden Gene führt bei Mausembryonen zu multiplen Fehlbildungen und frühem Absterben (Tab.1).

Die Knochenmorphogenesefaktoren und speziell BMP4 wurden mehrfach mit einem Einfluss auf die Entwicklung des Gefäßsystems und auf die Blutbildung beschrieben. So fördert BMP4 im Zusammenspiel mit anderen Zytokinen die hämatopoetische Differenzierung humaner embryonaler Stammzellen und fördert die Fähigkeit zur Selbsterneuerung früher hämatopoetischer Zellen (Chadwick et al. 2003). Für BMP2, 4 und 7 wurde ein Dosis-abhängiger Effekt auf Wachstum, Differenzierung und Oberflächenprofil sowie auf die Repopulationsfähigkeit hämatopoetischer Vorläuferzellen beschrieben. Speziell BMP4 führt danach in niedriger Konzentration zu einer raschen Differenzierung von CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup>-Zellen und einem Verlust der Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Höhere Konzentrationen führen zu einer Aufspaltung der Population in sich differenzierende und primitive Zellen, die die Fähigkeit zu Repopulation beibehalten (Bhatia et al. 1999). Auch soll BMP4 zur Differenzierung von

erythropoetischen Vorläuferzellen in Erythropoetin-reaktive erythropoetische Zellen führen und damit einen Beitrag bei der Bewältigung einer akuten Anämie im Mausmodell haben (Lenox et al. 2005). Weiterhin wird beschrieben, dass BMP4 die Proliferation früher Thymozytenstadien hemmt und diese in einem unreifen CD44<sup>+</sup>-CD25<sup>-</sup>-doppelt-negativen Zellstadium arretiert (Hager-Theodorides et al. 2002).

Mutiertes Gen	Phänotyp
BMP 2	Embryonaler Tod (E7,5-10,5); Defekte in der Amnion-/Chorionbildung und der Herzentwicklung
BMP 3	Lebensfähig; Vergrößerte Knochenmasse
BMP 4	Embryonales Absterben (E 7,5-9,5); Störung der Mesoderm-Bildung
BMP 5	Lebensfähig; Skelettmissbildungen; kurze Ohren, kurze Extremitäten
BMP 6	Lebensfähig; verzögerte Brustbein-Ossifikation
BMP 7/ OP1	Perinataler Tod; Schwere Defekte an Nieren und Augen; Missbildungen am Brustkorb, Schädel und hinteren Extremitäten
BMP 5/7	Embryonales Absterben (E10,5); Verzögerte Herzentwicklung
BMP 8B	Lebensfähig; Defekte in der Spermatogenese
BMP 14 (GDF 5)	Lebensfähig; Skelettmissbildungen; kurze Ohren, kurze Extremitäten
BMP15 (GDF 9)	Lebensfähig; Vermehrte Zwillings- und Drillingsgewürfen durch erhöhte Ovulationsrate bei Heterozygoten, Infertilität bei Homozygoten
GDF 8	Lebensfähig; Vergrößerte Muskelmasse und Körpergröße

Tab. 1 BMP-Mutationen und ihre Phänotypen; nach Korchynskyi und ten Dijke 2002

### 1.1.2 Funktion der Transformierenden Wachstumsfaktoren $\beta$ (TGF $\beta$ ) in der Hämatopoese

TGF $\beta$  ist ein sehr vielseitig wirkendes Zytokin, für das bislang bei Säugetieren drei Isoformen beschrieben wurden: TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 und - $\beta$ 3 (ten Dijke et al. 1990; Fortunel et al. 2000a). Diese haben sowohl einen positiven als auch einen negativen Effekt auf Zellwachstum, Differenzierung oder auch die Apoptose von Zellen unterschiedlicher Herkunft. Dabei ist das Entwicklungsstadium der Zelle, ihre natürliche Gewebenumgebung aber auch das Medium in seiner spezifischen Zusammensetzung bei In-

vitro-Kultur für das Ergebnis von Bedeutung (Fortunel et al. 2000a; Larsson und Karlsson 2005).

Für frühe CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen zeigten Van et al. in-vitro eine hohe Ansprechbarkeit auf die TGFβ1-vermittelte Zellzyklus-Hemmung (Van et al. 1996). Reifere CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>-Zellen waren nur wenig betroffen oder zeigten gar eine Stimulation. Dabei entsprachen die eingesetzten TGFβ-Konzentrationen denen, die eine andere Gruppe in der aktiven Form im menschlichem Plasma gefunden hat (Junker et al. 1996). Analog hierzu erhält TGFβ in In-vitro-Kulturen das Ruhestadium undifferenzierter CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen (Pierelli et al. 2002; Kim und Letterio 2003). Dabei kontrolliert und unterhält TGFβ die Expression des Oberflächenantigens CD34 der pluripotenten Stammzellen (Pierelli et al. 2002) und hemmt über die Hochregulation von p15 und p21 die G1- und G2-Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) und damit das Vorranschreiten im Zellzyklus. Auch unterdrückt TGFβ die Expression des c-myc-Onkogens. Dieses ist für das Stoppen des Fortgangs im Zellzyklus notwendig (Kim und Letterio 2003; Lin et al. 2005). Zugabe von TGFβ1-neutralisierenden Antikörpern und Stammzellfaktor (SCF) zu einer Kultur von CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup>-Zellen aus Nabelschnurblut führte hingegen zu einer verstärkten Proliferation (Akel et al. 2003).

Die schon oben für primitive Vorläufer beschriebenen bidirektionalen Effekte finden sich auch in den reiferen, linienbezogenen Vorläuferzellen. In der Erythropoese hemmt TGFβ frühe Zellen der Burst-forming-unit Erythroid (BFU-E), aber nicht spätere Formen (Fortunel et al. 2000b). Auf reifere Formen hat TGFβ sogar einen differenzierenden Effekt, indem es die Expression von Differenzierungsmarkern wie dem Glycophorin A fördert und die Hämoglobinsynthese induziert (Krystal et al. 1994). Auch für die granulozytäre-, mono- und makrozytäre Linie konnten die bidirektionalen Effekte gezeigt werden (Fortunel et al. 2000b).

Darüber hinaus wurde in verschiedenen Publikationen beschrieben, dass TGFβ die Expression von anderen Wachstumsfaktoren moduliert und so ebenfalls auf hämatopoetische Zellen Einfluss nehmen kann. Zum Beispiel fanden Dubois und Kollegen für den IL1-Rezeptor sowohl in murinen als auch in humanen Zellen eine Negativregulation durch TGFβ (Dubois et al. 1990). Ebenso wurde eine Herabregulierung für den cKIT-Rezeptor für hämatopoetische Zellen der Maus und des Menschen be-

schrieben. Diese kann die TGF $\beta$ -vermittelte Hemmung der Stammzellfaktor-Funktion erklären (McNiece et al. 1992; Dubois et al. 1994; Sansilvestri et al. 1995). Auch könne TGF $\beta$  das Thrombopoietin(TPO)-induzierte Wachstum von Vorläuferzellen über eine negative Modulation der cMPL-Expression aufheben (Ramsfjell et al. 1997; Fortunel et al. 2000a).

## 1.2 Die TGF $\beta$ / BMP-Signaltransduktion

### 1.2.1 Der Rezeptor

Die TGF $\beta$ /BMP-Signaltransduktion erfolgt über eine Gruppe von membranständigen Rezeptoren mit Serin-Threonin-Kinase-Aktivität, Activin receptor-like kinases (ALK) genannt. Es können sieben Typ I-Rezeptoren und fünf Typ II-Rezeptoren unterschieden werden (ten Dijke und Hill 2004) (Tab.2). Diese kommen jeweils als Dimere der Untereinheiten in der Zellmembran vor. Bindung eines Liganden an ein solches Dimer bewirkt eine für den Liganden charakteristische Oligomerisierung von Typ I- und Typ II-Untereinheiten, in deren Folge die Phosphorylierung des Typ I-Rezeptors durch die Typ II-Untereinheit erfolgt. Dadurch wird der Typ I-Rezeptor aktiviert (ten Dijke und Hill 2004; Korchynskyi und ten Dijke 2002).

Typ I-Rezeptoren	Typ II-Rezeptoren
ALK 1	BMPR-II
ALK 2 (ActR-I)	T $\beta$ R-II
ALK 3 (BMPR-IA)	T $\beta$ R-IIB
ALK 4 (ActR-IB)	ActR-IIB
ALK 5 (T $\beta$ R-I)	ActR-II
ALK 6 (BMPR-IB)	
ALK 7	

Tab. 2 Rezeptoren der TGF $\beta$ -Superfamilie

### 1.2.2. Signalübertragung via Smad-Molekülen

Die weitere intrazelluläre Signalübertragung erfolgt neben anderen Wegen auch mit Hilfe der Smad-Proteine. Es sind drei Smad-Untergruppen bekannt: rezeptorregulierte (R-), Co- und inhibierende (I-) Smads. Unter den R-Smads kennt man fünf Mo-

leküle, die üblicherweise in zwei Gruppen geteilt werden, in im TGFβ-/Aktivin-Signalweg wirkende Smads und durch BMP aktivierte Smads (Abb.1).

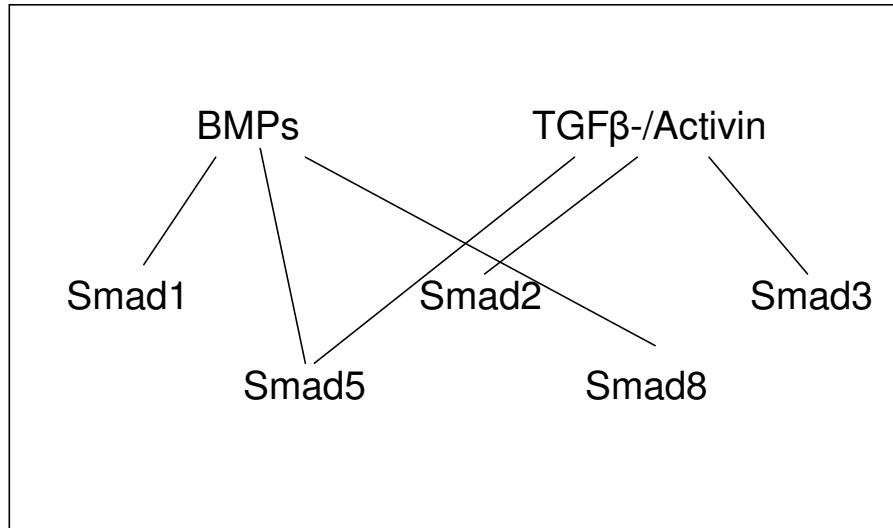


Abb. 1 Zuordnung der Smad-Moleküle zu den BMP- bzw. TGFβ-/Aktivin-Signalwegen; nach Shi und Massague 2003

Smad-Proteine bestehen aus einer MAD-homologen Domäne 1 (MH1) am N - Terminus, die den Transport in den Zellkern sowie die DNA-Bindung vermittelt, sowie der MH2-Domäne am C-Terminus, die an der Homo- und Heterodimerisierung von Smads, der Rezeptoraktivierung durch die Typ-1-Rezeptoren und der Interaktion mit Koaktivatoren bzw. –repressoren beteiligt ist. Das Bindeglied beider Domänen stellt die variable interne Prolin-reiche Region (Linker-Region) dar, die am Abbau der Smads beteiligt ist und über zahlreiche Phosphorylierungsstellen die Querverbindung zu anderen Signalwegen herstellt (Abb. 2; Shi und Massague 2003).

Die Aktivierung des TGFβ-Rezeptors führt zur Phosphorylierung der C-terminal gelegenen Serinreste (SSXS-Motiv) eines R-Smads. Dies ermöglicht durch räumliche, strukturelle Änderung des Moleküls die Zusammenlagerung mit weiteren R-Smads und dem Co-Smad 4. Diese Oligomere werden dann in den Zellkern geschleust. Hierfür ist eine Kern-Lokalisierungssequenz (NLS) in der MH1-Domäne von Bedeutung, die im inaktiven Zustand durch die MH2-Domäne verdeckt ist und durch Phosphorylierung und Oligomerisierung des Smad-Moleküles demaskiert wird. Smad 4 besitzt eine konstitutiv aktive NLS-Region sowie ein zusätzliches Kernexportsignal,

das seine zytoplasmatische Lokalisation in unstimulierten Zellen sichern soll (Korchynskyi und ten Dijke 2002; ten Dijke und Hill 2004).

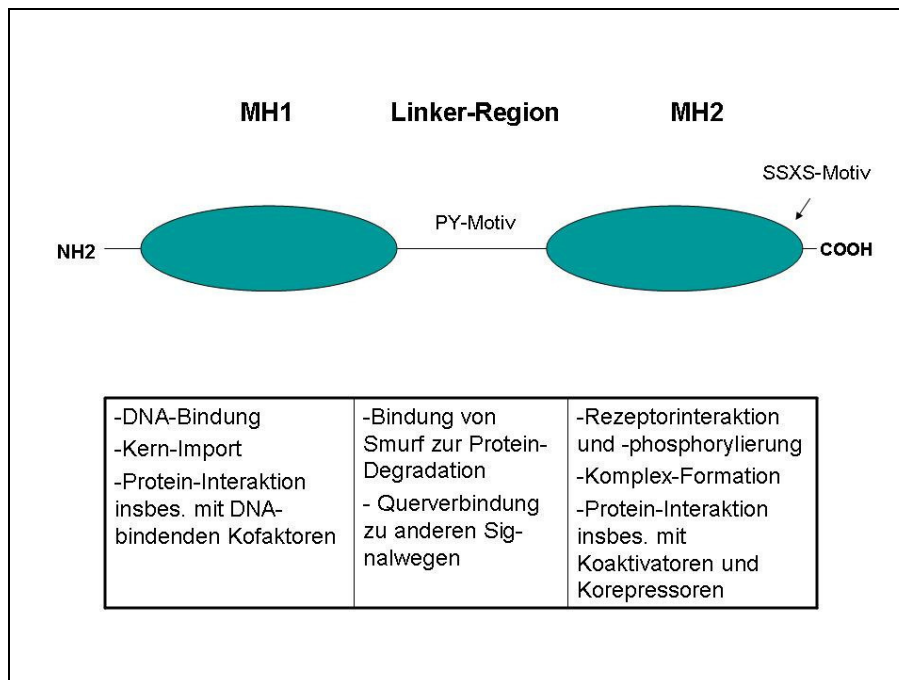


Abb. 2 Schematischer Aufbau von Smad-Proteinen, nach Shi und Massague 2003

Im Zellkern sind die Smad-Moleküle mit weiteren Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren an der Steuerung von Zielgenen beteiligt. R-Smads und Smad4 erkennen für die direkte Interaktion mit der DNA über ihre MH1-Domäne spezifische DNA-Sequenzen in den Promotorregionen ihrer Zielgene. Zum Beispiel binden Smad3 und 4 sowie Smad5 mit hoher Affinität die Basenfolge GTCT enthaltende Sequenzen, Smad-bindendes Element (SBE) genannt (Li et al. 2001). Das SBE ist von entscheidender Bedeutung für die TGFβ-induzierte Steuerung verschiedener TGFβ-responsiver Gene wie dem Smad7 oder dem Plasminogenaktivator-Inhibitor 1, in deren Genen sich dieses Element mit hoher Wiederholung findet (Li et al. 2001, Korchynsky und ten Dijke 2002). BMP-responsive R-Smads aber auch Smad3 und 4 wiederum binden an GCTA- oder GC-reiche Sequenzen in den Promotoren der BMP-Zielgene. Die Affinität dafür ist allerdings schwächer als für das SBE. Daher scheint die Kooperation mit anderen DNA-bindenden Faktoren, den so genannten Koaktivatoren, im BMP-Weg von besonderer Bedeutung zu sein. So interagieren Smad1, 2 und 4 über ihre MH2-Domäne mit den Proteinen p300 und CBP, die die DNA-Bindung erleichtern (Li et al. 2001).

### 1.2.3 Mechanismen der Negativregulation

Mechanismen für die Negativregulation der TGF $\beta$ /BMP-ALK-Smad-Signalkaskade sind auf jeder Ebene existent. Moleküle wie Noggin und Chordin kompetieren mit den BMPs um die Rezeptorbindung und hemmen so das Signal. Auch ist ein Pseudorezeptor, der „BMP und Aktivin membrangebundene Inhibitor“ (Bambi), gefunden worden. Dieser wird wiederum als kompetitiver Inhibitor bei der Ligandenbindung gesehen. Für die ERK- (extracellular signal-regulated kinase) MAPkinase wurde beschrieben, dass sie die Phosphorylierung von Smad1 in der Linker-Region vermittelt und dadurch die BMP-induzierte Akkumulation von Smad1 im Nukleus hemme (Korchynskyi und ten Dijke 2002). Eine besondere Bedeutung kommt den I-Smads Smad6 und 7 zu, die teilweise eine Kaskadespezifität aufweisen. So inhibiert Smad6 nur den BMP-Smad-Signalweg. Dagegen hemmt Smad7 neben dem BMP-Smad-Signalweg auch die Signaltransduktion in Folge von TGF $\beta$ - und Aktivinstimulation (Ishisaki et al. 1999; Ishida et al. 2000). Beide können dafür unterschiedliche Signalschritte behindern.

Der Abbau der Smad-Moleküle erfolgt mit Hilfe der „Smad ubiquitination regulatory factor“ (Smurf) 1 und 2. Diese binden an das PY-Motiv in der Linker-Region und führen das Protein dem Ubiquitin-abhängigen Abbau zu.

## 1.3 Smad5 und die alternative Spleißvariante Smad5 $\beta$

### 1.3.1 Smad5 und seine Bedeutung für die Hämatopoese

Smad5 ist ein an der Signaltransduktion des TGF $\beta$ /BMP-Signalweges beteiligtes R-Smad. Das Smad5-Gen ist auf Chromosom 5q31 lokalisiert. Es besteht aus acht Exons. Die Transkription beginnt im Exon 3 und endet in Exon 8 (Riggins et al. 1997; Hejlik et al. 1997; Gemma et al. 1998). Das Protein besteht aus 465 Aminosäuren und entspricht im Aufbau der oben beschriebenen Grundform der R-Smads (vgl. Abb.2).



Smad5 wird als im Rahmen des BMP-Signalweges wirkendes Signaltransduktionsmolekül beschrieben. Allerdings haben Funktions- und Strukturanalysen des Moleküls wiederholt Hinweise dafür erbracht, dass es ebenfalls im TGF $\beta$ -/Aktivin-Pfad von Bedeutung ist. So beschrieben Li et al. 2001 eine DNA-Bindungsfähigkeit, die von der traditionellen BMP-R-Smads Smad1 und 8 abweicht und der von Smad3 und 4 gleicht. In Übereinstimmung mit diesem Befund beschrieben Hariharan und Pillai (2006) die kristalline Struktur der MH1-Domäne von Smad5 in den für die DNA-Bindung bedeutsamen Anteilen als homolog zu der von Smad3. Auf funktioneller Ebene finden sich Ähnlichkeiten in den Phänotypen von Smad5- und TGF $\beta$ 1-Knockout-Mäusen (vgl. folgenden Absatz; Chang et al. 1999; Yang et al. 1999). In einer Arbeit von Bruno und Mitarbeitern finden sich Hinweise, dass Smad5 an der auf CD34<sup>+</sup>-Zellen hemmenden Wirkung des TGF $\beta$ -Signalweges beteiligt ist (Bruno et al. 1998). Liu und Kollegen zeigten in-vitro eine verminderte Empfänglichkeit von Smad5<sup>-/-</sup> frühen embryonalen hämatopoetischen Vorläuferzellen auf die durch TGF $\beta$  vermittelte Proliferationshemmung (Liu et al. 2003). Auch wurden abseits der Hämatopoese z.B. für epitheliale Zellen beschrieben, dass eine TGF $\beta$ -Signaltransduktion durch Smad5 vermittelt wird (Yue und Mulder 2001; Goumans et al. 2002).

Smad5 ist in verschiedenen Geweben ausgehend von Dottersack und Embryo bis hin zu unterschiedlichen adulten Geweben nachweisbar und scheint bei verschiedenen Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen beteiligt. Das vollständige Fehlen von Smad5 führt im Experiment an Knockout-Mäusen zum frühen Absterben der Embryonen (E9,5 -11,5) (Chang und Matzuk 2001; Bosman et al. 2006). Neben verschiedenen anderen Fehlbildungen, die u. a. die Achsenentwicklung betreffen (Chang et al. 2000; Bosman et al. 2006), weisen die Smad5<sup>-/-</sup>- Mausembryonen eine fehlerhafte Mesenchymbildung auf. Außerdem ist die Angiogenese gestört und die Inseln blutbildender Vorläuferzellen sind irregulär verteilt. Die Anzahl der myeloischen Kolonie-Bildenden Einheiten (CFU-GM) nicht aber die der erythroiden Kolonien ist erhöht. Die Differenzierung der Vorläuferzellen wird jedoch als regulär beschrieben (Yang et al. 1999). Die beschriebenen Smad5<sup>-/-</sup>-Phänotypen gleichen dabei jenen von BMP4-, TGF $\beta$ 1- oder T $\beta$ RII-Knockout-Mäusen (Chang et al. 1999; Yang et al. 1999).

Die Bedeutung für die embryonale Hämatopoese ist durch die zitierten Arbeiten bereits angeklungen. So zeigten Untersuchungen an Smad5-Knockout-Maus-embryonen eine irreguläre Verteilung der blutbildenden Inseln und eine erhöhte Anzahl von CFU-GM bei sonst erhaltener Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit (Yang et al. 1999). Des Weiteren wurde gezeigt, dass ein Verlust von Smad5 zu einer Gendosis-abhängigen Erhöhung der Zahl und der Regenerationsfähigkeit von frühen hämatopoetischen Vorläufern in der Embryogenese führt. Er geht mit einem verminderten Ansprechen auf die TGF $\beta$ -vermittelte Hemmung einher, wobei hohe TGF $\beta$ -Konzentration wieder zu einer Proliferationshemmung führen (Liu et al. 2003).

Darüber hinaus bestehen Hinweise, dass der BMP4/Smad5-Signalweg bei der Erythropoese von Bedeutung sein könnte. Fuchs und Mitarbeiter beschrieben eine Verminderung der Proliferation und Differenzierung von erythropoetischen Vorläufern bei Zerstörung des Smad5-Gens (Fuchs et al. 2002). In Übereinstimmung hierzu zeigten Lenox et al. (2005), dass die so genannte „flexed-tail“-Mutation bei Mäusen, die zu einer Anämie führt, auf eine Mutation im Smad5-Gen-Lokus zurückzuführen ist und dass der BMP4/Smad5-Signalweg, u. a. gesteuert durch Hypoxie, die Expansion und Differenzierung von erythropoiden Vorläufern in der Milz stimuliert. Für die myeloische Reihe insgesamt wurde Smad5 eine Bedeutung bei der TGF $\beta$ -vermittelten Proliferationshemmung zugeschrieben (Bruno et al. 1998). Im Gegensatz hierzu finden sich aber in einer neueren Studie Hinweise darauf, dass Smad5 allein keine oder nur eine geringe Bedeutung für die adulte Hämatopoese bei der Maus in-vitro und in-vivo hat (Singbrant et al. 2006). Allerdings bleibt dabei die Bedeutung des teils gleichsinnig wirkenden Smad1 für die Kompensation des Verlustes ungeklärt (Arnold et al. 2006).

Bei einem Teil der Fälle von Myelodysplastischem Syndrom (MDS) sowie Akuter Myeloischer Leukämie ist regelmäßig ein hemizygoter Verlust von Smad5 durch eine Deletion auf Chromosom 5q31 feststellbar. Dadurch wird Smad5 als potentiell Tumor-suppressorgen angesehen (Zavadil et al. 1997; Fenaux und Kelaidi 2006). Jedoch konnten in mehreren Untersuchungen an verschiedenen anderen Tumortypen keinerlei Mutationen innerhalb des Genes gefunden werden (Hejlik et al. 1997; Riggs et al. 1997; Zavadil et al. 1997; Gemma et al. 1998). Im Gegenteil wurde Smad5 sowohl im Kolorektalen Karzinom als auch in einer Zelllinie eines Hepatozellulären

Karzinoms überexprimiert gefunden (Korchynskyi et al. 1999; Zimonjic et al. 2003). Die Bedeutung dieser Befunde konnte noch nicht geklärt werden.

### 1.3.2 Smad5 $\beta$

Jiang et al. (2000) beschrieben eine alternative Spleißform von Smad5, das Smad5 $\beta$ . Die alternative Spleißstelle findet sich innerhalb des Exon 6. Durch die Prozessierung an dieser Stelle verkürzt sich das Protein auf 351 Aminosäuren, wobei die letzten 18 Bausteine neu hinzukommen. Hierunter findet sich vor allem Lysin (Abb.3). Durch die Verkürzung verliert die alternative Form einen Teil der funktionell bedeutsamen MH2-Domäne. Insbesondere das SSXS-Motiv sowie die für die Rezeptorinteraktion wichtige L3-Schleife gehen verloren. In Übereinstimmung hiermit wird durch die Autoren beschrieben, dass die alternative Form Smad5 $\beta$  weder mit Smad5 noch mit Smad4 Oligomere bildet.

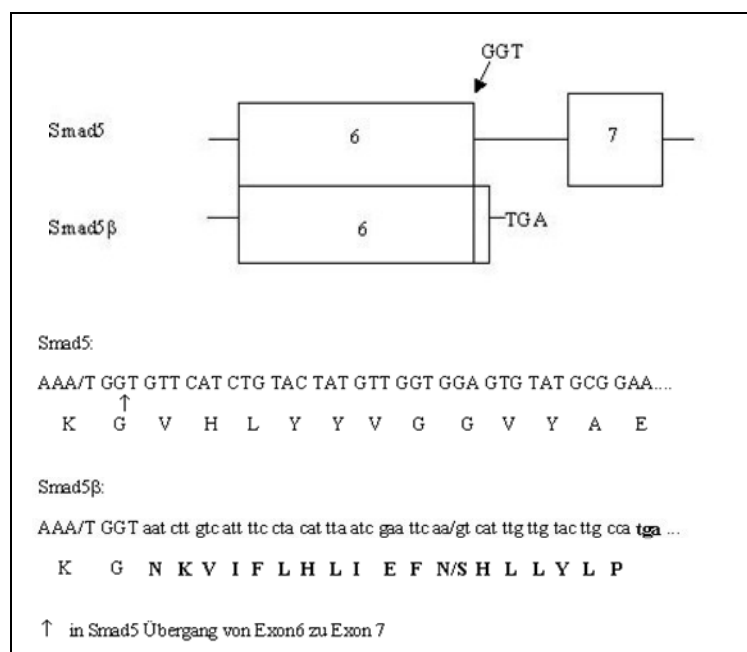


Abb. 3 Vergleich der Strukturen von Smad5 und Smad5 $\beta$  im Bereich der alternativen Spleißstelle, im oberen Teil dargestellt die Exon/Intron-Übergänge, im unteren Teil die Basen- bzw. Aminosäureabfolge, hinzugekommene Aminosäuren sind fett gedruckt, nach Jiang et al. 2000

Smad5 $\beta$ -mRNA konnte bis jetzt in mononukleären Zellen des peripheren Blutes, in CD34<sup>+</sup>-Zellen sowie in verschiedenen Leukämie- und Lymphomzelllinien nachgewiesen werden, wobei die gefundenen mRNA-Muster in einer Studie als nicht schlüssig

bezeichnet wurden (Jiang et al. 2000; Fuchs et al. 2002). Das Protein ist noch nicht beschrieben worden.

Jiang et al. (2000) stellen die These auf, dass Smad5 $\beta$  die Signalübertragung von TGF $\beta$  über eine kompetitive Hemmung von Smad5 bei der DNA-Bindung im Sinne eines Korepressors behindern könnte. Darüber hinaus ist auch eine weitere aktivierende aber auch hemmende Funktion des neu hinzugekommenen kurzen Abschnittes nicht ausgeschlossen. Die Autoren sehen in der Spleißvariante ein funktionelles Äquivalent zu inaktivierenden Mutationen, welches hämatopoetische Vorläuferzellen aber auch einen leukämischen Klon refraktär gegenüber BMP4 und TGF $\beta$  werden lassen kann.

#### 1.4 Akute myeloische Leukämie

Akute Leukämien entstehen durch Störungen im anfangs angedeuteten kompliziert regulierten Ablauf der Hämatopoese. Dabei kommt es bei der AML zu einer malignen Entartung eines myeloischen Zellklons, der im Knochenmark expandiert und die normale Blutbildung verdrängt. Dies kann zu Anämie, Granulozytopenie und Thrombozytopenie, begleitet von einer fakultativen Leukozytose, mit den entsprechenden spezifischen und unspezifischen Krankheitssymptomen führen.

##### 1.4.1 Epidemiologie

Auf der Grundlage der Daten des Tumorregisters München beträgt die geschätzte Inzidenz für die AML in den Jahren 1998-2006 für Männer ca. 3,7 und für Frauen ca. 2,6 Fälle pro 100.000 Einwohner. Dabei besteht für diese Erkrankung eine Altersabhängigkeit. Damit beträgt die Inzidenz in der Gruppe der 25-30jährigen 0,6 für Männer bzw. 0,2 für Frauen um in der Gruppe der 65-70jährigen auf 9,7 (Männer) bzw. 5,8 (Frauen) anzusteigen (Tumorregister München 2007). In der Literatur wird für die USA eine jährliche Inzidenz von 2,4 Fällen pro 100.000 Einwohner mit einem Anstieg bis auf 12,6 Fällen pro 100000 Einwohner, die 65 Jahre und älter sind, genannt (Lowenberg et al. 1999).

### 1.4.2 Ätiologie und Pathogenese

Für die meisten Patienten wird die genaue Krankheitsursache unbekannt bleiben. Bei einem Teil der Patienten, insbesondere mit sekundärer Erkrankung, kann eine vorangegangene Strahlen- oder Chemotherapie z.B. mit Alkylanzien Krankheitsursache sein (Kern et al. 2003).

Pathogenetisch gibt es eine Vielzahl von Mechanismen, die zur Leukämogenese beitragen. Deren Ausdruck findet sich teilweise in chromosomalen und molekularen Veränderungen, die meistens DNA-bindende Transkriptionsfaktoren oder regulatorische Komplexe betreffen. Häufige balanzierte Translokationen sind t(8;21) oder inv(16) bzw. t(16;16). Diese führen zu einer Funktionsstörung des Transkriptionsfaktors AML1-CBF $\beta$  (Lowenberg et al. 1999). So führt die bei bis zu 40% der Patienten mit AML FAB M2 auftretende Translokation t(8;21) zu einem Fusionsprotein aus AML1 und ETO. Das Wildtyp-Fusionsprotein AML1-CBF $\beta$  leitet eine Smad-vermittelte Transkriptionsinduktion infolge einer Aktivierung durch TGF $\beta$  ein. Dagegen führt das neue Fusionsprotein AML1-ETO zur Repression der basalen Transkription von TGF $\beta$ -responsiven Genen und hemmt die Aktivierung durch TGF $\beta$  (Jakubowski et al. 2000).

Neben diesen balanzierten Abberationen finden sich noch zahlreiche nicht-balanzierte Abberationen. Hierunter findet man einzelne Monosomien, zum Beispiel des Chromosoms 7 aber auch Trisomien der Chromosomen 8, 11 oder 21. Diese können einzeln vorkommen, sind aber häufiger im Rahmen von komplex abberanten Karyotypen vorhanden. Darüber hinaus werden Verluste einzelner Chromosomenregionen angetroffen. Am häufigsten hiervon betroffen sind der lange Arm des Chromosom 5, wobei es besonders häufig zum Verlust der Region 5q31-33 ("common deleted band"), sowie 7q und 17p kommt (Kern et al. 2003, Fenaux und Kelaidi 2006).

### 1.4.3 Klassifikation

FAB-Subtyp	Bezeichnung	Häufigkeit	Assoziierte zytogenetische Veränderungen	Zytochemische Färbung
M0	Akute Leukämie mit minimaler Differenzierung	3%	inv(3q26) t(3;3) (1%)	MPO - SB - NE - *
M1	Akute Myeloblastenleukämie ohne Reifungszeichen	15-20%		MPO + SB + NE -
M2	Akute Myeloblastenleukämie mit Reifungszeichen	25-30%	t(8;21) (40%), t(6;9) (1%)	MPO + SB + NE -
M3	Akute Promyelozytenleukämie	5-10%	t(15;17) (98%),	MPO +
M3v	Mikrogranuläre Promyelozytenleukämie		t(11;17) (1%), t(5;17) (1%)	SB + NE -
M4	Akute Myelomonozytäre Leukämie	20%	11q23 (20%), inv(3q26) und t(3;3) (3%), t(6;9) (1%)	MPO + SB + NE +
M4Eo	Akute Myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilenbeteiligung	5-10%	inv(16), t(16;16) (80%)	MPO + SB + NE +
M5a	Akute Monoblastenleukämie	2-9%	11q23 (20%),	MPO -
M5b	Akute Monozytenleukämie		t(8;16) (2%)	SB - NE +
M6	Akute Erythroleukämie	3-5%	t(1;22) (5%)	MPO + SB + NE -
M7	Akute Megakaryoblastenleukämie	3-12%		MPO - SB - NE +

Tab. 3 Die FAB-Klassifikation der AML mit häufigen genetischen Anomalien; MPO – Myeloperoxidase, SB – Sudan-Schwarz, NE – Unspezifische Esterase, \* Nachweis myeloischer Antigene (z.B. CD 13; 33) möglich; nach Lowenberg et al. 1999

Für die Klassifikation der AML haben sich inzwischen zwei Systeme etabliert. 1976 wurde die Klassifikation der „French-American-British (FAB) Cooperative Group“ eingeführt. Gefordert werden für die Diagnosestellung AML mindestens 30% Blasten im peripheren Blut oder Knochenmark. Die Kategorisierung der AML erfolgt anhand zytomorphologischer, zytochemischer und immunphänotypischer Merkmale in neun Gruppen (Tab.3; Lowenberg et al. 1999).

Die Anfang der 2000er Jahre vorgeschlagene WHO-Klassifikation für die AML verbindet Kriterien der FAB-Klassifikation mit zyto- und molekulargenetischen sowie klinischen Kriterien und der Prognose. Im Gegensatz zur FAB-Klassifikation ist der Grenzwert des Blastenanteiles im Blut oder Knochenmark zur Diagnosestellung auf 20% herabgesetzt worden. Zusätzlich werden Patienten mit bestimmten zytogenetischen Abnormalitäten [z.B. t(16;16); t(15;17); t(8;21)] unabhängig vom gefundenen Blastenanteil als an AML erkrankt angesehen. Darüber hinaus sind vier Untergruppen mit charakteristischen Merkmalen festgelegt worden (Tab.4; Vardiman et al. 2002).

WHO-Klassifikation der Akuten Myeloischen Leukämie
<p>1. AML mit wiederkehrenden zytogenetischen Abberationen</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- AML mit t(8;21)(q22;q22), (AML1/ETO)</li> <li>- AML mit abnormalen Eosinophilen sowie inv(16)(p13;q22)</li> <li>- Akute Promyelozytenleukämie mit t(15;17)(q22;q12)</li> <li>- AML mit 11q23</li> </ul>
<p>2. AML mit Myelodysplasie-assoziierten Eigenschaften</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- entwickelt aus MDS oder MDS/MPD</li> <li>- ohne vorangegangene MDS, aber mit Dysplasien bei mindestens 50% der Zellen in zwei oder mehr Linien</li> </ul>
<p>3. Therapie-Assoziierte AML und MDS</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- nach Therapie mit alkylierenden Substanzen/Bestrahlung</li> <li>- nach Therapie mit Hemmstoffen der Topoisomerase II</li> </ul>
<p>4. AML, nicht anderweitig klassifiziert</p>

Tab. 4 Die WHO-Klassifikation der Akuten Myeloischen Leukämie; nach Vardiman et al. 2002

#### 1.4.4 Prognose

Nach Kern et al. 2003 ist es heute bei ca. 60-80% der AML-Patienten möglich, eine vorübergehende Remission zu erreichen. Allerdings sind die dauerhafte Krankheitsfreiheit und damit die Heilung nur bei 30-40% der Patienten möglich (Kern et al. 2003). Um die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens auf die Therapie abzuschätzen, werden eine Reihe von unterschiedlichen klinisch-biologischen Merkmalen herangezogen. Zu den ungünstig einzuschätzenden Faktoren zählen zum Beispiel ein Alter über 60, die Therapie-assoziierte Erkrankung, die sekundäre AML oder die Leukozytenzahl über 20.000/ $\mu$ l (Lowenberg et al. 1999). Auch bestimmte Karyotypen wie die Deletion des langen Arms von Chromosom 5 (del5q) oder Monosomien von Chromosom 5 oder 7 oder Merkmale der Arzneimittelresistenz zählen dazu. Auf der Basis dieser Merkmale können drei Risikogruppen unterschieden werden. So können in der Gruppe mit der besten Prognose, in die z.B. Erkrankungen mit einer Translokation t(8;21) oder t(16;16) fallen, bis 70% anhaltende Remissionen erzielt werden (Kern et al. 2003). Am anderen Ende des Prognosespektrums steht eine Gruppe, die ca. 15% der Patienten umfasst. Die Erkrankungen dieser Patienten zeigen Veränderungen wie die Deletion des langen Arms von Chromosom 5 (del5q) oder Monosomien von Chromosom 5 oder 7 und betreffen vor allem ältere Patienten mit sekundärer AML. Der Anteil von Remissionen über fünf Jahre hinaus wird mit 10% bis unter 20% beschrieben (Kern et al 2003; Lowenberg et al. 1999). Die Gruppe mit mittlerem Risiko soll ca. 70% aller Patienten einschließen.



## 2. Ziele der Arbeit

Wie oben dargelegt sind Störungen in der Signalübermittlung in hämatopoetischen Vorläuferzellen entscheidende Mechanismen bei der Leukämogenese. Der Transkriptionsfaktor Smad5 wurde wiederholt im Zusammenhang mit der embryonalen und adulten Hämatopoese untersucht und gilt als möglicher Tumorsuppressorfaktor (Zavadil et al. 1997). Verluste der gentragenden Region auf dem langen Arm des Chromosomen 5 (del5q) und besonders der Regionen 5q31-33 kommen bei einem Teil der Fälle von MDS und AML vor und sind mit einer schlechten Prognose verbunden (Zavadil et al. 1997; Lowenberg et al. 1999; Fenaux und Kelaidi 2006). Mutationen im Smad5-Gen konnten in eingehenden Untersuchungen nicht festgestellt werden (Hejlik et al. 1997; Riggins et al. 1997; Zavadil et al. 1997; Gemma et al. 1998). Jiang et al. (2000) beschrieben in Zelllinien, abgeleitet von AML und MDS, eine verkürzte Spleißform des Smad5, das Smad5 $\beta$ . Ziel der Arbeit war es zunächst, zu untersuchen, ob Smad5 $\beta$  im Blut von gesunden Probanden gefunden werden kann und ob dabei ein Zusammenhang zur myeloischen oder zur lymphatischen Reihe hergestellt werden kann. Im Weiteren beschäftigt sich die Arbeit mit der Expression von Smad5 $\beta$  sowohl im peripheren Blut, als einfach zu erhaltendes Probenmaterial, als auch im Knochenmark von an AML erkrankten Patienten. Schließlich sollten die gefundenen Expressionsmuster mit verschiedenen, relevanten klinischen Parametern statistisch ausgewertet werden, um einen möglichen Zusammenhang der Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  und diagnostisch und prognostisch bedeutsamer Erscheinungen zu überprüfen. Damit soll die klinische Bedeutung der Expression von Smad5 $\beta$  eingeschätzt werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Patientenmaterial

Für die Expressionsuntersuchungen wurde peripheres Blut gesunder Probanden und von Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie (AML) verwandt.

Die Proben gesunder Probanden wurden entweder frisch aufgearbeitet ( $n = 23$ ) oder entstammen der am Onkologischen Forschungslabor bestehenden Serum- und Leukozytenbank, wo sie bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden ( $n = 19$ ). Der Altersmedian der gesunden Probanden, von denen elf weiblich und zwölf männlich bzw. in der Serumbankfraktion acht weiblich und elf männlich waren, betrug 25 Jahre (Mittelwert 31,21 Jahre) bzw. 26 Jahre (Mittelwert 34,63 Jahre).

Die Patientenproben ( $n_{\text{AML}} = 54$ ;  $n_{\text{MDS}}=8$ ) stammten aus der Serum- und Leukozytenbank. Bei dieser Gruppe lag der Altersmedian bei 54 Jahren (Mittelwert 50,46 Jahre). Sie setzte sich aus 28 weiblichen und 26 männlichen Patienten in der AML-Gruppe zusammen. Darüber hinaus wurden von Dr. S. Scholl (Klinik für Innere Medizin II) cDNA von Proben aus Knochenmark bei Diagnosestellung einer AML zur Verfügung gestellt, die vor der Aufarbeitung als Zellpellet bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden. Die 31 Patienten, von denen die Proben stammen, zeigen einen Altersmedian von 57 Jahren (Mittelwert 54,8 Jahre). Dazu zählten 20 weibliche und elf männliche Patienten.

Durch das Zellanalyselabor der Klinik für Innere Medizin II (Frau Prof. Dr. K. Pachmann) wurden nach deren Untersuchung zur Verfügung gestellte Knochenmarksproben von an AML erkrankten Patienten bei Diagnosestellung genutzt ( $n= 20$ ), die einen Altersmedian von 56 Jahren (Mittelwert 54,2 Jahre) aufwiesen. Von diesen waren acht Personen weiblich und zwölf männlich. Zusätzlich wurden auch Knochenmarksproben von Patienten unter bzw. nach Therapie ausgewertet, die an einer AML erkrankt waren und die zum Zeitpunkt der Analyse bereits eine komplette Remission

erreicht hatten (n=7, sechs weiblich, ein männlicher Patient, Altersmedian 68 Jahre, Mittelwert 59,9 Jahre) oder solche Patienten, bei denen unter dem Verdacht auf eine hämatologische Erkrankung oder bei einer hämatologischen Erkrankung eine Diagnostik durchgeführt wurde, das Knochenmark aber einen Normalbefund aufwies. Diese sieben Proben wurden ebenfalls nach Auswertung durch das Zellanalyselabor zur Verfügung gestellt und wiesen einen Altersmedian von 65 Jahren (Mittelwert 58,3 Jahre) auf. Sie stammten von zwei männlichen und fünf weiblichen Patienten.

Für die retrospektiven Untersuchungen von Knochenmarkproben, welche bei Erstdiagnose einer Akuten Myeloischen Leukämie von an der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums Jena diagnostizierten und behandelten Patienten isoliert wurden, liegen zwei positive Ethikvoten vor (Projekte von Herrn Dr. med. S. Scholl).

### 3.1.2 Zelllinien

Darüber hinaus wurden Zelllinien auf ihre Expressionsmuster untersucht. Die verwendeten Zelllinien sind in Tab. 5 dargestellt.

Zelllinie	Tumorart
U 937	Histiozytisches Lymphom
WSU-NHL	B-Zell-Lymphom
K562	CLL
CEM	T-ALL
Mutz 1	MDS
HL-60	AML FAB M2
NB 4	Akute Promyelozytenleukämie FAB M4
THP-1	Akute Monozytische Leukämie AML FAB M5
MV4-11	Akute Monozytische Leukämie AML FAB M5
Mono-Mac-6	Akute Monozytische Leukämie AML FAB M5
MOLM 13	AML FAB M5a
Hel	Akute Erythrozytenleukämie AML FAB M6
MCF 7	Adenokarzinom der Brust

Tab. 5 Übersicht über die Expression der untersuchten Zelllinien

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Isolierung von Leukozyten

Als Ausgangsmaterial wurden mit Antikoagulantien (Heparin oder EDTA) versetztes peripheres Blut oder Knochenmarkaspirate verwendet. Diese wurden mit 5ml Erythrozytenlysepuffer (Qiagen, Hilden) pro ml Probe gemischt und 10 Minuten inkubiert. Danach wurde die Suspension zentrifugiert (10 min, 400g, 4 °C) und der Überstand verworfen. Der Vorgang wurde einmal wiederholt. Die isolierten Proben wurden danach entweder direkt der RNA-Isolation zugeführt oder bei einer Temperatur von minus 80 °C gelagert.

### 3.2.2 Auftrennung der Zellfraktionen aus dem peripheren Blut

Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll wurden die Proben peripheren Blutes in mononukleäre Zellen und Granulozyten getrennt oder es erfolgte die Auftrennung in einzelne Zellfraktionen mit Hilfe von MicroBeads (MACS).

#### 3.2.2.1 Auftrennung mit MicroBeads

##### 3.2.2.1.1 Magnetische Markierung

Die aus der Erythrozytenlyse gewonnenen Leukozyten wurden zunächst in 4ml PEB-Puffer (PBS pH 7,2, 0,5 % BSA, 2mM EDTA) resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 50 µl der Zellsuspension mit 20 ml Isoton-Lösung (Beckman Coulter) gemischt und die Anzahl der Zellen pro ml am Coulter Counter Z2 bestimmt. Danach wurde die Suspension bei 300g für zehn Minuten zentrifugiert, der Überstand komplett abpipettiert und das Pellet in 80 µl Puffer pro  $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert. Anschließend wurden pro  $10^7$  Zellen 20 µl eines magnetisch markierten Antikörpers (MicroBeads, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) zugebenen, gut gemischt und für 15 Minuten bei 4-8 °C im Kühlschrank inkubiert. Es wurden hierfür Antikörper gegen die Oberflächenantigene CD (Cluster of Differentiation) 3, 15, 19 und 33 (Tab.6) verwandt. Begonnen wurde jeweils mit CD 15, gefolgt von CD33, CD3 und

schließlich von CD19. Die einzelnen Trennungsschritte mussten jeweils wiederholt werden. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 1-2 ml Puffer pro  $10^7$  Zellen gewaschen und für 10 Minuten

Oberflächenantigen	Verteilung
CD 3	T-Zellen
CD 15	Neutrophile und Eosinophile Granulozyten Monozyten
CD 19	B-Zellen dendritische Zellen
CD 33	Monozyten Myeloische Vorläuferzellen Granulozyten

Tab. 6 Ausgewählte Oberflächenantigene und ihre zelluläre Verteilung

bei 300g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 500 µl Puffer pro  $10^8$  Zellen resuspendiert.

### 3.2.2.1.2 Magnetische Zellseparation

Für die nun folgende Zellseparation wurde eine Trennungssäule der Fa. Miltenyi Biotec im MACS-Separator (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) platziert und mit 500 µl PEB-Puffer vorbereitet. Verwandt wurden jeweils in den ersten beiden Durchläufen eine LS-Trennungssäule (empfohlen für  $10^5$ - $10^8$  markierte Zellen bei einer Gesamtzellzahl von  $10^7$  bis  $2 \times 10^9$ ) sowie die kleinere MS-Trennungssäule (jeweils Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach; empfohlen für bis zu  $10^7$  markierte Zellen bei einer Gesamtzellzahl bis  $2 \times 10^8$ ) in den folgenden beiden Durchläufen. Auf diese wurde die vorbereitete Zellsuspension aufgetragen und die nicht über einen entsprechenden Antikörper magnetisch markierten Zellen durch das dreimalige Waschen mit 500 µl Puffer entfernt. Diese Fraktion der unmarkierten Zellen wurde in einem Sammelgefäß aufgefangen, die Zellzahl bestimmt und nach einer Zentrifugation einer weiteren Auftrennung zugeführt. Die Säule wurde nach dem Waschen aus dem Magnetfeld entfernt und die magnetisch markierten Zellen nach dem Auftragen von 1ml Puffer gewonnen. Nachdem ihre Zahl bestimmt worden war, wurden sie sofort der RNA-Lyse zugeführt.

### 3.2.2.2 Dichtegradientenaufreinigung

Alternativ wurde aus einer zweiten Probe desselben Probanden eine Abtrennung der mononukleären Zellen mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierzu wurde eine fertige Biocoll-Trennlösung (Biochrom, Berlin) mit einer Dichte von 1,077g/ml verwandt. Diese Lösung enthält Ficoll® 400 bzw. Polysucrose 400, ein Polymer mit einem Molekulargewicht von etwa 400.000 Dalton. Zur Separation von Lymphozyten wurde ein 15ml-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) mit 7 ml Biocoll-Trennlösung (Dichte 1,077 g/ml) beschickt und 9 ml des mit 4,5 ml PEB-Puffer verdünnten Vollblutes vorsichtig über die Biocoll-Trennlösung geschichtet. Die Trennung erfolgte durch Zentrifugation bei 1200g für 20 min, wobei die Zentrifuge am Ende auslaufen musste und nicht abgebremst werden durfte. Die mononukleären Zellen finden sich in einer weißlichen Schicht zwischen dem Plasma und der Trennlösung und sollen eine 70 - 100% Anreicherung aufweisen. Diese Schicht wurde mit einer Pasteur-Pipette abgehoben und zweimal mit PEB-Puffer gewaschen, wobei das erste Mal für 10 min bei 300g und das zweite Mal für 10 min bei 200 g zentrifugiert wurde. Anschließend erfolgte die Zellzahlbestimmung.

Der die reifen Granulozyten und die Erythrozyten enthaltende Unterstand wurde mit Erythrozytenlysepuffer bestückt und nach obigem Verfahren verarbeitet, die Granulozytenkonzentration anschließend bestimmt und weiterverarbeitet.

### 3.2.3 Zellkultur

Bei den verwandten Zelllinien handelt es sich fast ausnahmslos um Suspensionszelllinien. Die Zellen lagerten bei minus 196 °C in flüssigem Stickstoff, in einem Einfriermedium aus 70 % RPMI 1640 (Gibco, Karlsruhe), 20 % fetalem Kälberserum (FCS, Greiner, Frickenhausen) und 10 % DMSO (SIGMA, München). Die Zellsuspension wurde bei 40°C aufgetaut, in ein 15 ml-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) gegeben und innerhalb von zehn Minuten durch langsames Zugeben von 10 ml RPMI 1640 mit 10% FCS (1 ml/min) verdünnt. Nach der Zentrifugation (5 min, 1000 U/min, 21 °C) wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 5ml RPMI 1640 mit 10% FCS resuspendiert. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (25qcm, Greiner, Frickenhau-

sen) gegeben, im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) für zwei bis drei Tage kultiviert und anschließend in eine 75 qcm Zellkulturflasche überführt, in der die weiteren Kultivierungen erfolgten.

Die Zellen wurden alle zwei bis vier Tage gesplittet. Hierzu wurde die Suspension in ein 50ml-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) überführt und bei 1000 U/min und 21 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert und je nach Grad des Splittings ein Aliquot in eine Zellkulturflasche überführt und diese mit Medium auf 20 ml aufgefüllt.

Die Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  sowie des Referenzgens  $\beta$ -Aktin wurde jeweils nach 48h Kultur in RPMI 1640 und 10% FCS (Ausnahme CEM: 20% FCS) bestimmt.

Die Bestimmung des Einflusses der Kulturbedingungen auf die Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  erfolgte repräsentativ an den Zelllinien U937, Hel sowie MOLM13. Es wurden je 6 Zellkulturflaschen (75 qcm, Greiner, Frickenhausen) angelegt. In jede Flasche wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in RPMI 1640 + 10% FCS ausgesät. Nach einer Anwuchsphase über 24 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurden die Zellen in einem serumfreien, einem 2% bzw. 10% FCS enthaltendem Medium resuspendiert und nach 24 respektive 48 Stunden zur RNA-Isolierung geerntet.

### 3.2.4 RNA-Isolierung

Nach der Aufarbeitung der Zellkultur und der Leukozyten schloss sich die Isolierung der Gesamt-RNA an. Dafür wurde der RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen, Hilden, genutzt. Zur Zellyse wurde hierbei das Zellpellet in 500 $\mu$ l Lysepuffer, bestehend aus 495 $\mu$ l RLT-Puffer und 5 $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol, gelöst und für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Das entstandene Lysat wurde weiter in die QIAshredder Spinsäule (Qiagen, Hilden) überführt und zur Homogenisation 2 Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde das Zentrifugat mit 500 $\mu$ l Ethanol 70 % gut gemischt und jeweils 500 $\mu$ l des Gemisches in einer RNeasy Mini-Säule 15 Sekunden bei 10000 U/min zentrifugiert. In diesem Schritt soll die RNA selektiv in der Silicagelmembran der Säule zurückgehalten und in den nachfolgenden Waschschritten aufgereinigt

werden. Hierzu schloss sich eine Inkubation mit 500 µl RW1-Waschpuffer für weitere zehn Minuten mit nachfolgender Zentrifugation (10000 U/min für 15 Sekunden) sowie eine einmalig wiederholte Zentrifugation (10000 U/min für 15 Sekunden, dann zwei Minuten) nach Zugabe von 300µl RPE-Waschpuffer an. Zuletzt wurde die isolierte mRNA mittels 50µl RNase-freiem Wassers durch Zentrifugation bei 10000 rpm über eine Minute aus dem Filtereinsatz gelöst. Die gewonnene mRNA wurde in ihrer Konzentration photometrisch am Nanodrop ND 1000 Spektrophotometer mit der Softwareversion 3.1.0 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington) gemessen und sofort weiterverarbeitet oder bei -80 °C gelagert.

### 3.2.5 cDNA-Synthese

Für die Synthese der cDNA aus isolierter mRNA wurden jeweils 1µg mRNA oder 8,5 µl RNA-Lösung (bei wenig Ausgangsmaterial) eingesetzt. Diese wurden einer anfänglichen Erwärmung für 5 Minuten auf 65 °C zur Auflösung von Sekundärstrukturen unterzogen. Danach folgte die Zugabe von 11,5µl Reaktionslösung: 4µl 5x Reaktionspuffer (250mM Tris-HCl, pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, Invitrogen, Karlsruhe), 2 µl DTT ( 10mM, Invitrogen, Karlsruhe), 1µl oligo-dT (16µM, Roche, Basel), 1µl Random Hexamer Primer (0,15µg/µl, Invitrogen, Karlsruhe), 2µl dNTP-Stammlösung (2,5mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0,5µl RNase Out (40U/µl, Invitrogen), 1µl M-MLV Reverse Transkriptase (200U/µl, Invitrogen, Karlsruhe). Die Lösung wurde gemischt, 10 Minuten bei Raumtemperatur sowie weitere 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 95°C über 8 Minuten beendete die cDNA-Synthese. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

### 3.2.6 RT-PCR

Die RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) wurde jeweils für Aktin als Referenzgen, Smad5 und Smad5β durchgeführt. Die eingesetzten Primer sind in Tabelle 7 dargestellt.

Aus einer Arbeit von Bathia et al. 1999 entstammt die Sequenz für den Smad5-Primer, der zur Amplifikation eines Fragmentes führt, das ein Teil der MH2-Domäne von Smad5 kodiert und von Exon 7 bis 8 reicht. Die verwendeten Smad5β-Primer



sind aus der Originalarbeit von Jiang et al. 2000 entlehnt. Sie führen zur Amplifikation eines Fragmentes, welches im Exon 6 beginnt und bis in das Intron 6 des Smad5-Genes reicht. Dieses Fragment beinhaltet die Spleißstelle, die Basentriplets der hinzukommenden 18 Aminosäuren und endet nahe einem alternativen Poly-A-Signal.

Primer	Sequenz	Annealingtemperatur in °C
B-Aktin	CGGGAAATCGTGCGTGACAT	60,1
B-Aktin	GAAC TTTGGGGGATGCTCGC	60,2
Smad5	TGTTGGTGGAGAGGTGTA	52.8
Smad5	AGATATGGGGTTCAGAGG	52.1
Smad5β	TAAACAATCGTGTTGGAGAAGC	59.3
Smad5β	ATACATTCTTCAATATCGGCAACT	58.2

Tab. 7 Nukleotidsequenz der verwendeten Primer

Für die PCR wurde jeweils ein µl cDNA verwandt, zu dem 24µl des Reaktionsansatzes zugegeben wurden. Dieser wurde aus 18,3µl hochgereinigtem, DNase-freiem Wasser, 2,5µl 10xPCR-Puffer (Qiagen, Hilden), 2,0µl dNTP, 1,0µl Primer und 0,2µl Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden) hergestellt. Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte in TRIO-Thermoblöcken (Biometra, Göttingen). Sie setzte sich zusammen aus jeweils einer initialen Denaturierung für drei Minuten bei 95°C, gefolgt von 28 Zyklen (β-Aktin) respektive 34 bzw. 32/34 Zyklen (Smad5 und Smad5β): Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden, Annealing mit 60,5°C für 30 Sekunden (β-Aktin) bzw. 56°C (Smad5) oder 61°C (Smad5β) für 20 Sekunden sowie Elongation bei 72°C für 20 (β-Aktin) bzw. 30 Sekunden (Smad5, Smad5β). Abschließend folgt ein Zyklus bei 72°C über fünf Minuten.

Die spezifischen PCR-Produkte hatten eine Länge von 355bp (Smad5), 307bp (Smad5β) sowie 712bp (β-Aktin).

### 3.2.7 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mittels einer Agarosegel-Elektrophorese. Hierfür wurden 2%ige Agarosegele verwandt. Die Agarose (Invitrogen) wurde in einer

entsprechenden Menge 1xTBE-Puffer (20ml 50x TBE: 162,2g Tris Base; 27,8g Borsäure; EDTA ( $\text{Na}_2$ , 2x  $\text{H}_2\text{O}$ ); 1000ml DEPC-Wasser; pH8) gelöst und aufgekocht. Nach anschließender Abkühlung auf 60°C konnte 3µl Ethidiumbromid pro 150ml Gel zugefügt werden. Mit dieser gebrauchsfertigen Lösung wurden die mit Kämmen vorbereiteten Gelträger gefüllt. Nach der Auspolymerisation wurde das Gel in die Gelkammer eingesetzt, mit 1x TBE-Puffer bedeckt und die Geltaschen mit den PCR-Produkten bestückt.

Dafür wurde eine Lösung aus 10µl PCR-Probe und 10µl PCR-Puffer (10mM Tris-HCL, 1mM  $\text{Na}_2$ -EDTA; 0,1% SDS; 30% Glycerin; 0,0025% Bromphenolblau; DEPC-Wasser; pH8) in die Geltaschen geladen. In die ersten Taschen wurde jeweils ein 1kb DNA-Längenstandard (Invitrogen, Karlsruhe) und die Negativkontrolle aus der PCR gegeben. Der Gellauf erfolgte bei 200V.

Die Auswertung wurde am UV-Illuminator Image Master VDS und dem Intas Gel Image der Firmen Pharmacia Biotech (San Francisco) und Intas (Göttingen) mit der Software LisCap2.0 sowie der Analysesoftware von Intas durchgeführt. Zur densitometrischen Auswertung wurde die AIDA Image Analyser Software Version 3.52 genutzt.

### 3.2.8 Real-Time-PCR

#### 3.2.8.1 Herstellung von Standards

Für die Durchführung der Real-Time-PCR mussten Standardproben mit bekannten Konzentrationen an Aktin-, Smad5- und Smad5β-DNA hergestellt werden.

##### 3.2.8.1.1 Aufreinigung von PCR-Produkten aus einem Agarosegel

Dazu wurden zunächst Smad5- und Smad5beta PCR-Produkte mit Hilfe des QiaEx Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aus einem Agarosegelstück nach vorheriger Agarosegelelektrophorese herausgelöst. Hierfür wurden zu der ausgeschnittenen DNA-Bande 900µl QX1 sowie nach 30-sekündigem Mischen QiaEx II zugegeben und für zehn Minuten bei 50°C inkubiert, wobei alle zwei Minuten gemischt wurde. Folgend

wurde bei 14000rpm für 30 Sekunden zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 500µl QX1 gewaschen und erneut zentrifugiert. Hierdurch sollten alle bestehenden Agarosegelverschmutzungen entfernt werden. Nach Verwerfung der Pellets wurde zur Beseitigung restlicher Salzverunreinigungen mit 500µl PE-Puffer gewaschen und erneut bei 14000rpm für 30 Sekunden zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmalig wiederholt. Das Pellet wurde nun über zehn bis 15 Minuten luftgetrocknet und danach in 20µl destilliertem Wasser gelöst und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abschließender Zentrifugation (14000rpm, 30 Sekunden) konnte die gereinigte DNA mit dem Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt werden.

#### 3.2.8.1.2 Einklonierung der DNA-Fragmente

Die so gewonnene und gereinigte DNA wurde in den pCR II-TOPO-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) einkloniert und in E.coli transformiert. Dafür wurden 2µl des PCR-Produktes mit 2µl sterilem Wasser, 1µl Salzlösung sowie 1µl TOPO-Vektor vorsichtig gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden 2µl dieses Ligationsansatzes zu One-Shot-E.coli (Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben, für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert und dann für 30 Sekunden einem Hitzschock von 42°C ausgesetzt. Danach wurden 250µl des SOC-Medium zugegeben und bei 37°C für eine halbe Stunde auf einem Schüttler inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden Kulturplatten mit 4µl IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactosid) und 40µl X-Gal vorbereitet. Danach wurden 100µl des Ligationsansatzes auf einer vorbereiteten Kulturplatte ausplattiert und bei 37°C über Nacht bebrütet.

Nach erfolgreicher Einklonierung und Transformierung des Vektors in die Bakterien verlieren diese die Fähigkeit das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase zu bilden. Das auf die Platten aufgebrachte Substrat kann nicht mehr gespalten und durch den Farbstoff X-Gal blau angefärbt werden, d.h. die gewünschten Kolonien bleiben weiß. Solche weißen Kolonien wurden nach der Bebrütung vorsichtig abgepickt, in ein 15ml-Röhrchen mit 5ml LB-Medium (Bacto-tryptone, Bacto-yeast Extrakt, NaCl) sowie 1µl Ampicillin/ml Medium überführt und über Nacht erneut bebrütet.

#### 3.2.8.1.3 Gewinnung der Plasmid-DNA

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA aus der Übernachtskultur erfolgte mit Hilfe des „Plasmid Purification Maxi Kit“ (Qiagen, Hilden). Zunächst wurde die Suspension bei 6000rpm über 15 Minuten (4 °C) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10ml P1-Puffer resuspendiert. Hinzugefügt wurden 10ml P2-Puffer, dann ruhte die Mischung über fünf Minuten zur Zellyse. Anschließend wurden 10ml P3-Puffer zugegeben und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde die Lösung zentrifugiert (12000rpm bei 4 °C für 30 Minuten), der DNA-haltige Überstand vorsichtig abgenommen und dieser erneut zentrifugiert (12000rpm bei 4 °C für 15 Minuten). In der Zwischenzeit wurde eine Qiagen-Säule 500 mit 10ml QBT-Puffer äquilibriert und der Überstand aus der Zentrifugation auf diese überführt. Nach Passage wurde die Säule zweimal mit 30ml QC-Puffer gewaschen und anschließend die Plasmid-DNA mit 15ml QF-Puffer eluiert. Aus jedem Zwischenschritt wurde ein Aliquot des Eluates zur Gelanalyse der Aufreinigung gewonnen und mit einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Die DNA wurde durch Isopropanol (10,5ml) präzipitiert, bei 15000 rpm für 30 Minuten (4 °C) zentrifugiert, das Pellet mit 5ml 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (15000 rpm, 4 °C, 10 Minuten). Folgend wurde das Pellet luftgetrocknet, in 500µl Tris-Puffer gelöst und die Konzentration photometrisch am Nanodrop ND 1000 Spektrophotometer mit der Softwareversion 3.1.0 (NanoDrop Technologies Inc.) bestimmt. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

#### 3.2.8.1.4 Restriktionsverdau

Die einklonierten DNA-Fragmente wurden mit EcoR1 (Smad5) oder mit EcoRV und BamH1 (Smad5β) aus dem Plasmid herausgeschnitten. Hierfür wurden pro µl Plasmid-DNA 12µl H<sub>2</sub>O, 15µl Puffer und 1µl des Restriktionsenzymes eingesetzt und der Ansatz bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde ein Aliquot auf ein 2% Agarosegel aufgetragen, die gewünschten Fragmentbanden herausgeschnitten und nach oben beschriebener Methode aufgereinigt.

Anschließend wurden nach photometrischer Konzentrationsmessung Verdünnungsreihen der spezifischen Fragmente von 0,1 µg/ml bis 0,01ng/ml zur Verwendung als Standards für die Real-Time-PCR hergestellt, aliquotiert und tiefgefroren. Ein entsprechendes Kontrollfragment für  $\beta$ -Aktin wurde vom Onkologischen Forschungslabor zur Verfügung gestellt.

### 3.2.8.2 Durchführung der Real-Time-PCR

Die Real-Time PCR ermöglicht die qualitative und quantitative DNA-Bestimmung in einer Reaktion. Sie erfolgte am Light-Cycler der Firma Roche (Basel) mit dem Fast Start DNA Master Plus SYBR Green I Kit (Roche).

Der verwendete Farbstoff SYBR Green I emittiert Licht in einer Wellenlänge von 530nm. SYBR Green I bindet Sequenz-unabhängig doppelsträngige DNS (dsDNS) und erfährt durch die Bindung eine Verstärkung seiner Fluoreszenz (Bustin 2000). Somit kommt es mit jeder Amplifizierung auch zu einem Anstieg der Fluoreszenz, die jeweils nach jedem PCR-Zyklus gemessen wird. Entscheidend für die Quantifizierung der PCR-Produkte ist die Phase der exponentiellen Zunahme der Produktmengen bzw. der Zyklus an deren Beginn, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant aus der Hintergrundfluoreszenz heraustritt. Dieser Zyklus wird auch „Threshold-Cycle“ ( $C_t$ ) genannt. Der  $C_t$ -Wert einer Probe kann nun gegen eine Standardkurve abgetragen werden und daraus die initiale Menge der cDNA berechnet werden. Die Standardkurve wird aus den  $C_t$ -Werten von spezifischen Fragmenten errechnet, deren Konzentration bekannt ist. Der  $C_t$ -Wert verhält sich dabei indirekt proportional zum Logarithmus der anfänglichen Fragmentkonzentration (Rasmussen et al. 1998, Bustin 2000).

Zum qualitativen Produktnachweis wird am Schluss einer jeden Real-Time PCR eine Schmelzpunktbestimmung angeschlossen. Hierzu wird die Temperatur ausgehend von 60°C um 0,2K pro Sekunde auf 99°C gesteigert. Dabei denaturieren unspezifische Produkte zu einem früheren Zeitpunkt also bei geringerer Temperatur als spezifische (Rasmussen et al. 1998, Bustin 2000). In Abb. 4 ist beispielhaft eine Schmelz-

kurve für Smad5 dargestellt. Die spezifische Schmelztemperatur des Smad5 liegt bei ~85 °C. Unspezifische PCR-Produkte denaturieren bereits bei ca. 78 °C.

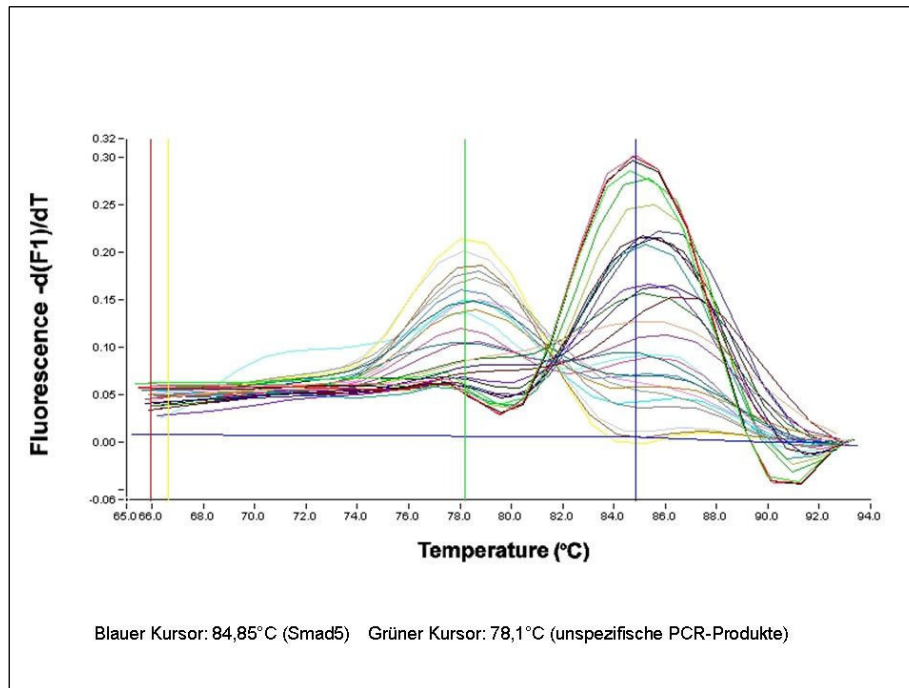


Abb. 4 Beispiel einer Smad5-Schmelzkurve

Da der Farbstoff SYBR Green I nicht Sequenz-spezifisch ist, stellt sich insbesondere bei geringen Transkriptmengen und hoher Konzentration unspezifischer Produkte das Problem, dass auch diese zum Fluoreszenzanstieg führen. Um auch in diesem Fall nur die Emission des gewünschten PCR-Produktes zu bestimmen, kann die Messung der Fluoreszenz so gelegt werden, z.B. zwei Kelvin unterhalb der spezifischen Schmelztemperatur, dass unspezifische Produkte bereits denaturiert sind, spezifische aber noch nicht (Morrison et al. 1998).

Der eingesetzte Fast Start DNA Master Plus SYBR Green I Kit (Roche, Basel) ist ein nahezu gebrauchsfertiger Reaktionsmix. Zur endgültigen Herstellung des Reaktionsmixes (Master Mix) müssen 14µl Fast Start Taq Polymerase zu einem Röhrchen 1a (enthält Reaktionspuffer, MgCl<sub>2</sub>, SYBR Green 1 und dNTP [dUTP statt dTTP]) hinzugefügt werden. Das Enzym ist durch eine blockierende Gruppe bei Raumtemperatur inaktiv. Anschließend wurden jeweils 1µl cDNA in die Glaskapillaren (Roche, Basel) vorgelegt und 19µl Reaktionsansatz (14µl H<sub>2</sub>O, 4µl Master Mix, 1µl Primer) dazugegeben, die Mischung vorsichtig in die Kapillaren hinein zentrifugiert und diese dann in das Karussell des Light-Cycler-Gerätes eingesteckt.

dazugegeben, die Mischung vorsichtig in die Kapillaren hinein zentrifugiert und diese dann in das Karussell des Light-Cycler-Gerätes eingesteckt.

Zu Beginn einer jeden PCR erfolgte die Aktivierung des Enzyms durch Erhitzen auf 95°C für 10 Minuten. Es schlossen sich je 40 (Aktin), 42 (Smad5 $\beta$ ) bzw. 45 (Smad5) Amplifizierungszyklen an. Diese setzten sich aus einem Denaturierungsschritt bei 95°C, einem Annealingschritt (jeweils 59°C für 10 Sekunden) und der Verlängerungsphase bei 72°C für 17 Sekunden zusammen. Am Ende eines jeden Zyklus wurde in jeder Kapillare die Fluoreszenz gemessen. Für Smad5 erfolgte aufgrund hoher unspezifischer Fragmentmengen die Fluoreszenzmessung bei 82°C, gehalten für eine Sekunde. Nach Abschluss der Amplifizierung folgte die Schmelzpunktbestimmung nach dem oben beschriebenen Modus. Die spezifischen Schmelztemperaturen sind für Aktin ~ 94°C, Smad5 ~ 85°C sowie Smad5 $\beta$  ~ 81°C (Abb. 5).

Die Auswertung wurde mit der Light Cycler Analyse Software 3.5.28 (Roche, Basel) ausgeführt.

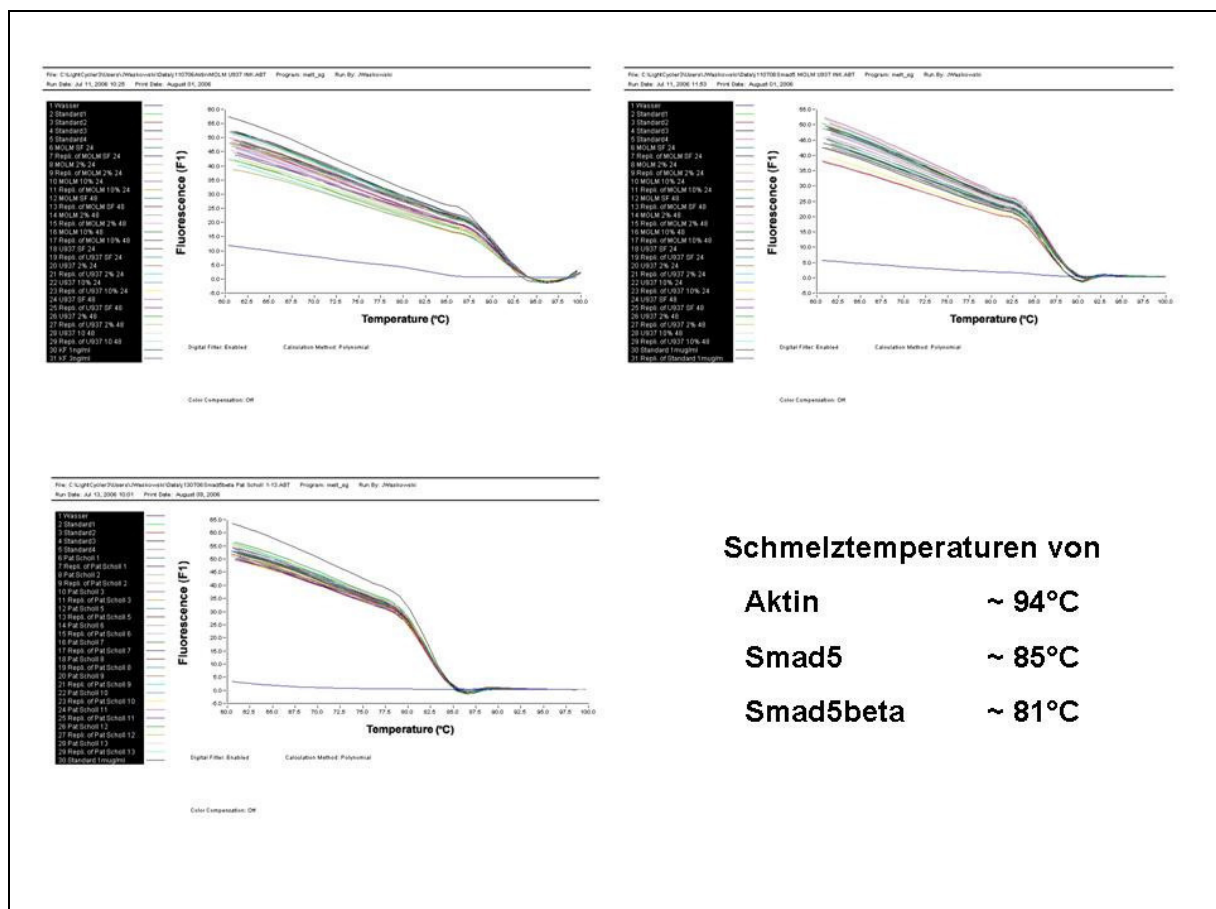


Abb. 5 Schmelztemperaturkurven von  $\beta$ -Aktin, Smad5 und Smad5 $\beta$  (von links oben)

### 3.2.9 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS Version 14.0. Verwandt wurden parametrische und nicht-parametrische Tests. Auf mögliche Abhängigkeiten der Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen der Zelllinien wurde mit Hilfe des T-Tests für verbundene Stichproben getestet. Im Falle der Auftrennung der Zellfraktionen sowie der Auswertung der Mediumversuche wurde global nach Friedman getestet. Die weitere Testung wurde hier mit der Methode nach Wilcoxon durchgeführt. Für die Probanden- und Patientenproben wurden als parametrische Tests der Kruskal-Wallis-Test zur globalen Untersuchung und zur weiteren Testung der Mann-Whitney-Test verwandt. Aufgrund notwendiger Mehrfachtestung wurden für die p-Werte eine  $\alpha$ -Adjustierung nach der Methode von Holm-Shaffer angewandt. Auf Korrelationen wurde jeweils mit der Methode nach Pearson oder der Methode nach Spearman-Rho untersucht. Signifikanzen wurden ab dem Zehn-Prozent-Niveau ( $p < 0,1$ ) angegeben.



### 4. Ergebnisse

Mit der Aufarbeitung der Proben sowie den Expressionsuntersuchungen wurde zunächst an Proben von Zelllinien und Proben des peripheren Blutes gesunder Normalpersonen begonnen.

Um den durch die sehr unterschiedlichen Zellzahlen und die daraus gewonnenen RNA-Mengen der einzelnen Proben bedingten Konzentrationsunterschieden gerecht zu werden, wurden die ermittelten Konzentrationen von Smad5- und Smad5 $\beta$ -mRNA jeweils immer auf die als Referenzgen mitbestimmte  $\beta$ -Aktin-mRNA angegeben. Der Unterschied zwischen Smad5 und Smad5 $\beta$  der einzelnen Probe soll durch die Darstellung als Quotient Smad5 $\beta$  zu Smad5 veranschaulicht werden.

#### 4.1 Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$ in Zelllinien hämatologischer Erkrankungen

##### 4.1.1 Expression unter nativen Kulturbedingungen

Bereits in den Arbeiten von Jiang et al. (2000) und Fuchs et al. (2002) wurden Smad5 und Smad5 $\beta$  in verschiedenen Zelllinien hämatologischer Erkrankungen, darunter die Zelllinien K562, U937, Hel und HL60, nachgewiesen. Für diese Arbeit wurden zunächst diese und andere Zelllinien zur Etablierung der Methode in ihrem Expressionsmuster für beide mRNA-Varianten untersucht.

Auch in den hier verwandten „Nicht-AML-Zelllinien“ (U937, WSU-NHL, K562, CEM, Mutz1 sowie die Brustkrebszelllinie MCF7) und den AML-Zelllinien (HL60, NB4, THP1, MV4-11, Mono-Mac-6, MOLM13, Hel) konnte die Expression sowohl von Smad5-mRNA als auch von Smad5 $\beta$ -mRNA nachgewiesen werden. In Abbildung 6 sind repräsentative PCR-Bilder dargestellt. Die Banden-Intensität wurde densitometrisch semi-quantitativ bestimmt und jeweils Smad5 und Smad5 $\beta$  gegen Aktin sowie Smad5 $\beta$  gegen Smad5 abgetragen (Abb. 7). Auffallend ist zunächst, dass sich die solide Brustkrebszelllinie MCF7 in ihrer Expression der beiden Spleißvarianten abhebt und die niedrigsten Konzentrationen zeigen. Dabei entspricht die Zelllinie im stöchiometrischen Verhältnis aber den meisten anderen Linien.

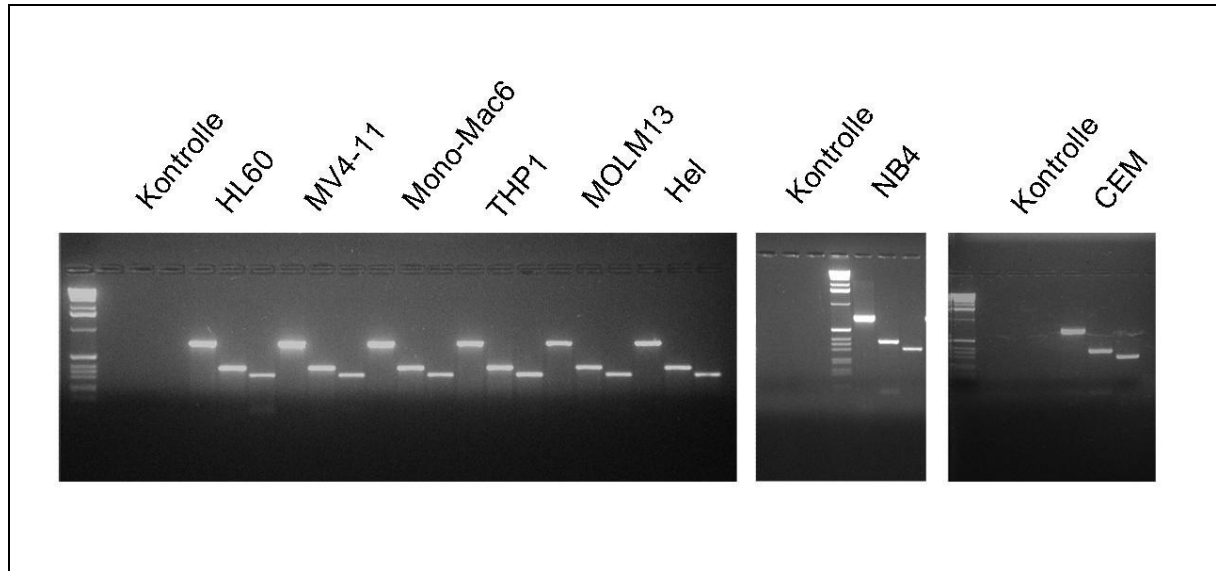


Abb. 6 Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  in repräsentativen RT-PCRs in von Akuter Myeloischer Leukämie abgeleiteten Zelllinien, aufgetragen wurden jeweils  $\beta$ -Aktin (712bp), Smad5 (355bp) und Smad5 $\beta$  (307bp) für eine Probe

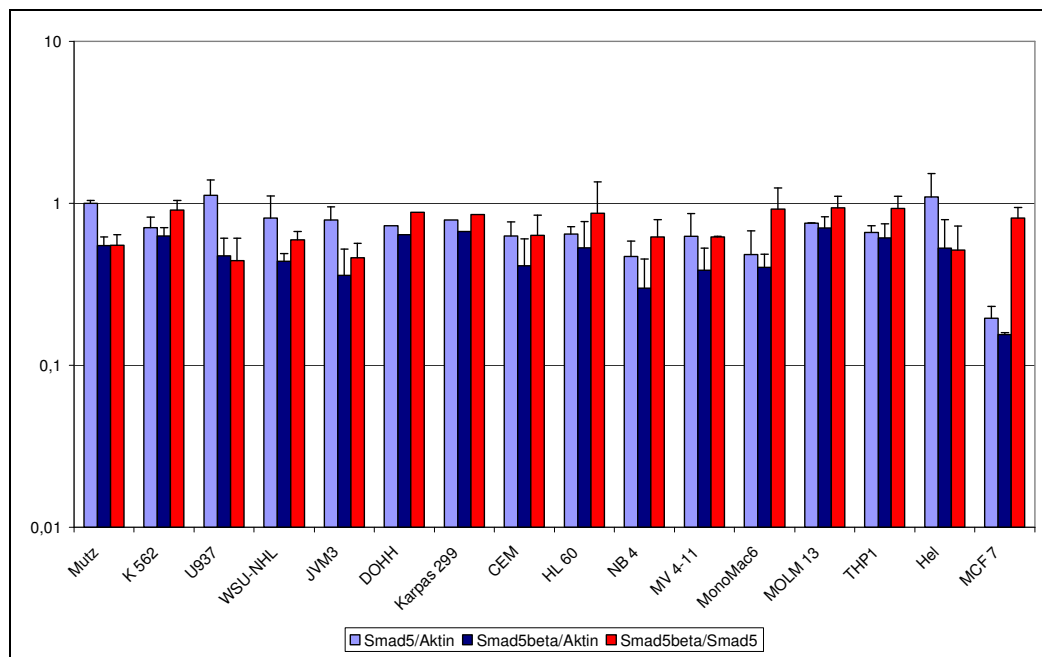


Abb. 7 Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  bezogen auf  $\beta$ -Aktin sowie Smad5 $\beta$  bezogen auf Smad5, ermittelt über densitometrische Auswertung von RT-PCR-Bildern verschiedener Zelllinien

Zur Bestimmung der quantitativen Unterschiede in der Expression beider mRNA-Varianten von Smad5 wurden die Expressionen auch mittels Real-Time PCR bestimmt. Es konnten beide ebenfalls in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Dabei wurden in den meisten Zelllinien jeweils höhere Smad5-Konzentrationen als Smad5 $\beta$ -Konzentrationen bestimmt. Allein bei den Zelllinien U937 und MOLM 13 lag der Quotient Smad5 $\beta$ /Smad5 über 1,0, d. h. es wurde mehr Smad5 $\beta$  als Smad5 exprimiert (Abb.8).

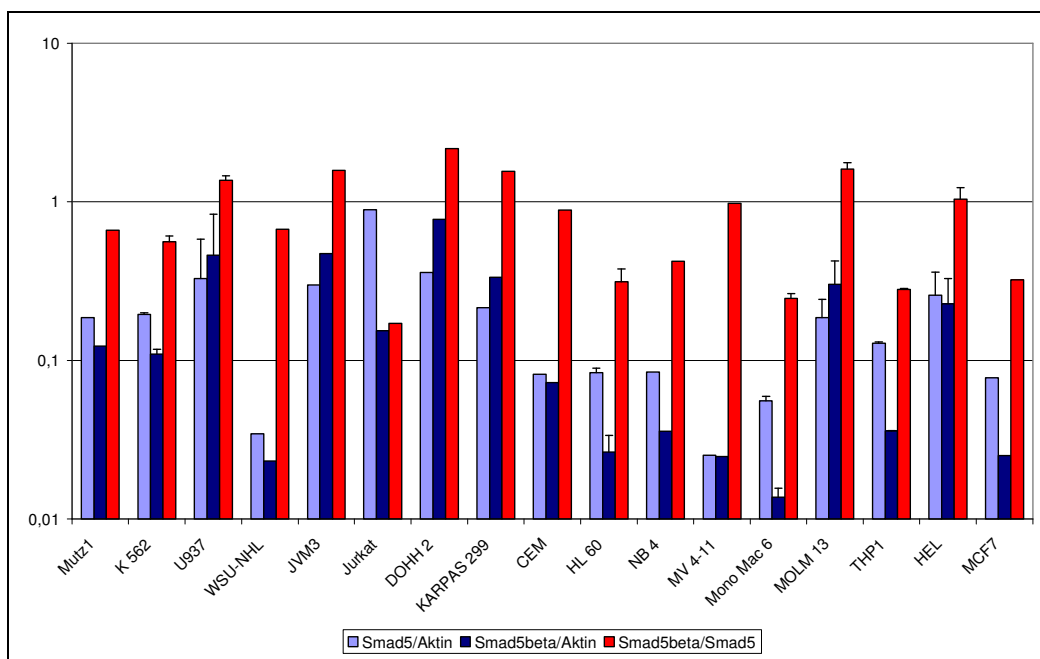


Abb. 8 Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  bezogen auf  $\beta$ -Aktin bzw. Smad5 $\beta$  bezogen auf Smad5, ermittelt in Real-Time PCR für verschiedene Zelllinien

## 4.1.2 Untersuchung der Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$ in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen bei drei ausgewählten Zelllinien

Um den Einfluss der Kulturbedingungen, speziell des Serumgehaltes des Kulturmediums und der Dauer der Kultur, auf die Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  zu ermitteln, wurden aus den untersuchten Zelllinien U937 als Nicht-AML-Zelllinie sowie MOLM13 und Hel für die AML-Zelllinien ausgewählt. Alle drei sind einfach kultivierbar und zeigten in den Voruntersuchungen in etwa angegliche Expressionen. Sie wurden mit unterschiedlichen Serumkonzentrationen über 24 und 48 Stunden

inkubiert. Diese Versuche wurden jeweils drei- (U937, Hel) bzw. viermal (MOLM13) wiederholt.

### 4.1.2.1 MOLM 13

Für MOLM13 ergibt sich numerisch eine Tendenz hin zur höheren Expression der beiden Smad5-mRNA-Varianten mit steigendem Serumgehalt des Kulturmediums und mit zunehmender Kulturdauer. So ergibt das Zellwachstum über 48 Stunden mit 10% fetalem Kälberserum im Medium eine konstant größere Expression von Smad5 $\beta$  im Vergleich zu Smad5 nach zuvor eher ausgeglichenen Expressionsmustern beider. Hochsignifikant ist der Unterschied in der Smad5 $\beta$ -Expression für den Vergleich zwischen der eintägigen und der zweitägigen Kultur im Medium mit 10% FCS ( $p < 0,01$ , T-Test). Signifikante und schwach-signifikante Unterschiede lassen sich aber ebenfalls für die Expressionsunterschiede von Smad5 in den Kulturen der SF-24h-Kultur versus 10%FCS-48h-Kultur, für die Expression von Smad5 $\beta$  zwischen den 24h-Kulturen und der Kultur in 10% FCS über 48 Stunden sowie für die Expression von Smad5 $\beta$  in der SF- und 2%-Kultur der Zelllinie über 48 Stunden und der 10%haltigen FCS-Kultur über 48 Stunden finden. Alle anderen getesteten Bedingungen sind im Unterschied weder für Smad5/Aktin noch für Smad5 $\beta$  bezogen auf Aktin bzw. Smad5 $\beta$  abgetragen auf Smad5 signifikant (Abb. 9-11).

### 4.1.2.2 Hel

In der Erythroleukämie-Zelllinie Hel ist die Smad5-Expression höher als die Smad5 $\beta$ -Expression. Die Expression beider mRNA-Varianten ist nach 24h in der Kultur am geringsten, die 2% Kälberserum enthält. Am höchsten ist sie in den beiden serumfreien Kulturen sowie in den 2% FCS-haltigem Medium nach 48h Zellwachstum (Abb. 12). In der statistischen Auswertung mit dem T-Test konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

## Ergebnisse

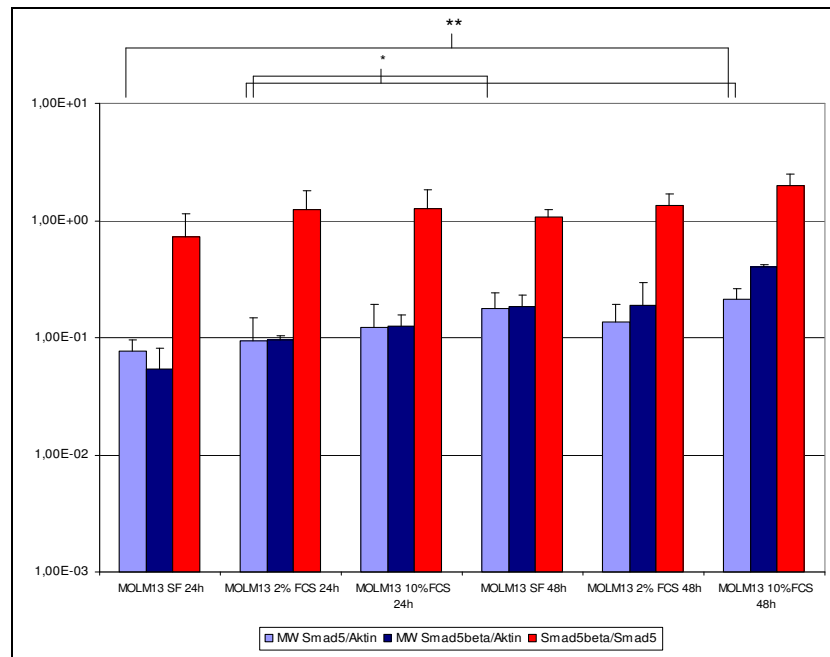


Abb. 9 Expression von Smad5 und Smad5β bezogen auf β-Aktin bzw. Smad5β bezogen auf Smad5 in der AML-Zelllinie MOLM13 in Abhängigkeit von Serumgehalt des Kulturmediums und der Kulturdauer, Werte aus Real-Time-PCR, Fokus auf Smad5; \*  $p < 0,1$ , \*\*  $p < 0,05$

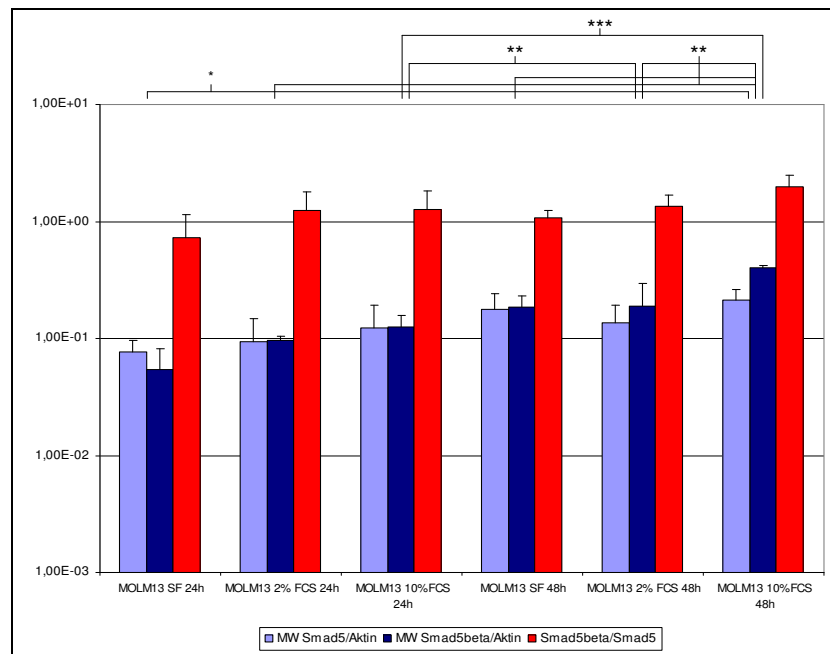


Abb. 10 Expression von Smad5 und Smad5β bezogen auf β-Aktin bzw. Smad5β bezogen auf Smad5 in der AML-Zelllinie MOLM13 in Abhängigkeit von Serumgehalt des Kulturmediums und der Kulturdauer, Werte aus Real-Time-PCR, Fokus auf Smad5β \*  $p < 0,1$ , \*\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,01$

## Ergebnisse

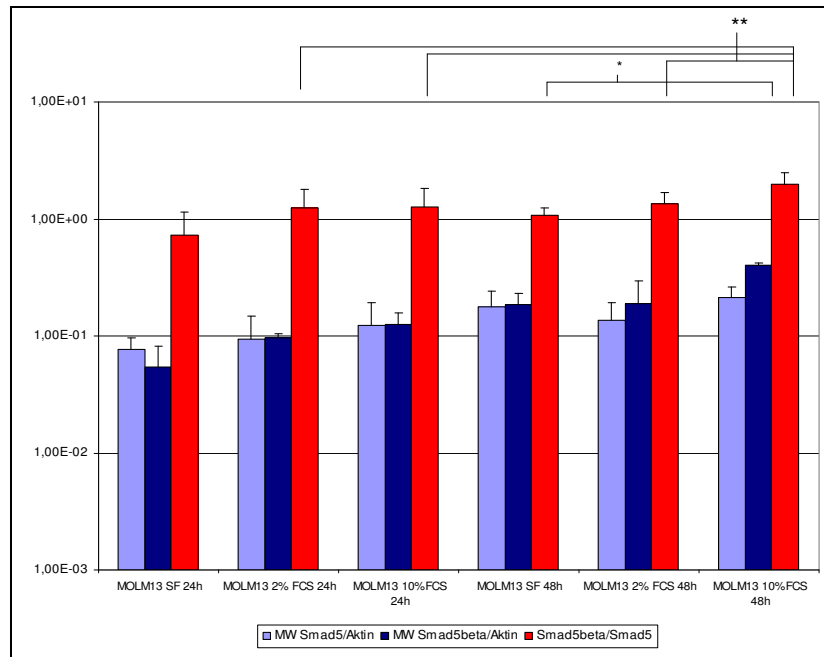


Abb. 11 Expression von Smad5 und Smad5β bezogen auf β-Aktin bzw. Smad5β bezogen auf Smad5 in der AML-Zelllinie MOLM13 in Abhängigkeit von Serumgehalt des Kulturmediums und der Kulturdauer, Werte aus Real-Time-PCR, Fokus auf Quotient aus Smad5β und Smad5; \*  $p < 0,1$ , \*\*  $p < 0,05$

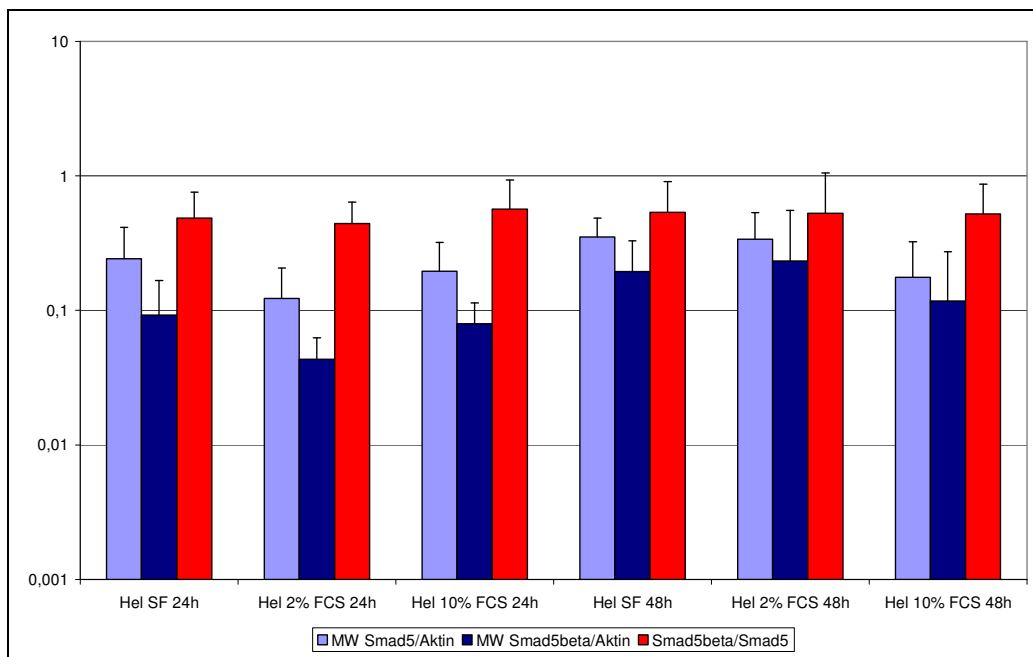


Abb. 12 Expression von Smad5 und Smad5β bezogen auf β-Aktin bzw. Smad5β bezogen auf Smad5 in der AML-Zelllinie Hel in Abhängigkeit von Serumgehalt des Kulturmediums und der Kulturdauer, Werte aus Real-Time-PCR

#### 4.1.2.3 U937

U937, eine Lymphom-Zelllinie, zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie die Hel-Zelllinie. Die vollständige Smad5-Variante ist immer in größeren mRNA-Leveln nachweisbar als ihre alternative Spleißvariante. Ein Expressionsminimum für Smad5 und Smad5 $\beta$  wird nach 24 Stunden mit 2% Kälberserum im Medium gefunden. Ein Maximum scheint es nach 48-stündigem Wachstums in serumfreiem und in 2%FCS enthaltendem Medium zu geben. Statistisch signifikante Unterschiede konnten nicht ermittelt werden (Abb. 13).

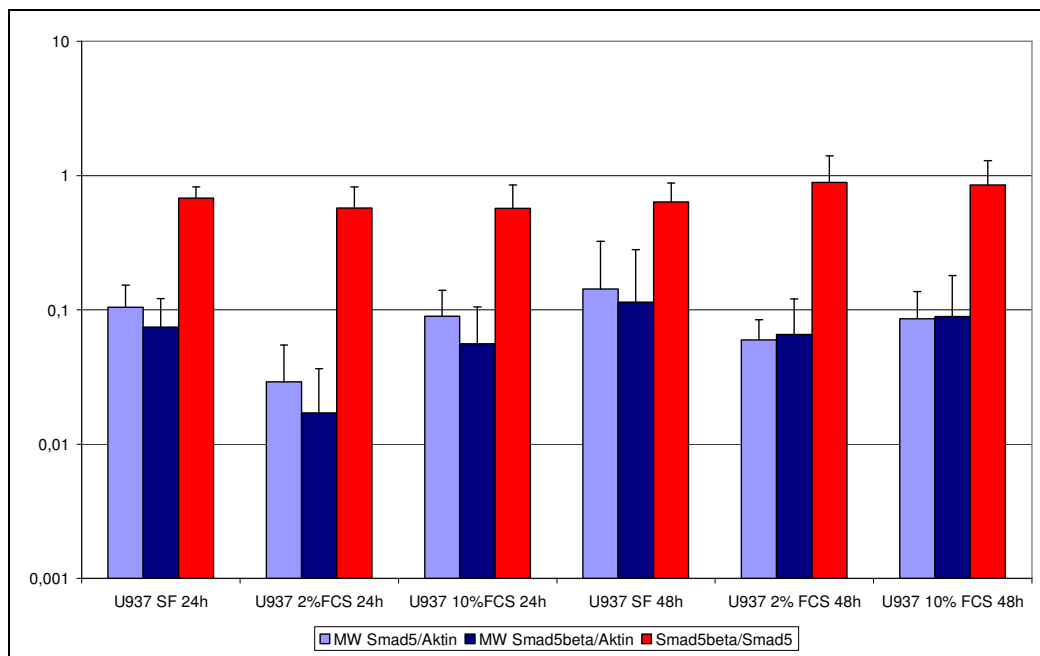


Abb. 13 Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  bezogen auf  $\beta$ -Aktin bzw. Smad5 $\beta$  bezogen auf Smad5 in der Lymphomzelllinie U937 in Abhängigkeit von Serumgehalt des Kulturmediums und der Kulturdauer, Werte aus Real-Time-PCR

#### 4.2 Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$ in den Leukozyten aus dem peripheren Blut gesunder Probanden

##### 4.2.1 Expression in frisch bis zur mRNA aufgearbeiteten Leukozytenproben aus dem peripheren Blut gesunder Probanden

Untersucht man die aus dem peripheren Blut gewonnenen, sofort bis zur mRNA aufgearbeiteten Leukozyten auf die Smad5- und Smad5 $\beta$ -Transkription, kann man ähnlich der Zelllinien in allen Proben beide mRNA-Varianten nachweisen (Abb. 14)

Die quantitative Expression mittels Real-Time-PCR beider Varianten weist aber durchgehend ein anderes stöchiometrisches Verhältnis auf. In den 23 untersuchten Proben ist hierbei die Expression von Smad5 $\beta$  ausnahmslos größer als die von Smad5, wobei der Median des Quotienten Smad5/Smad5 $\beta$  4,4 beträgt (Minimum 1,5; Maximum 34) (Abb.16). Die Expression beider Smad5-Varianten korreliert signifikant miteinander ( $r = 0,85$ ;  $p < 0,001$ , Test nach Pearson).

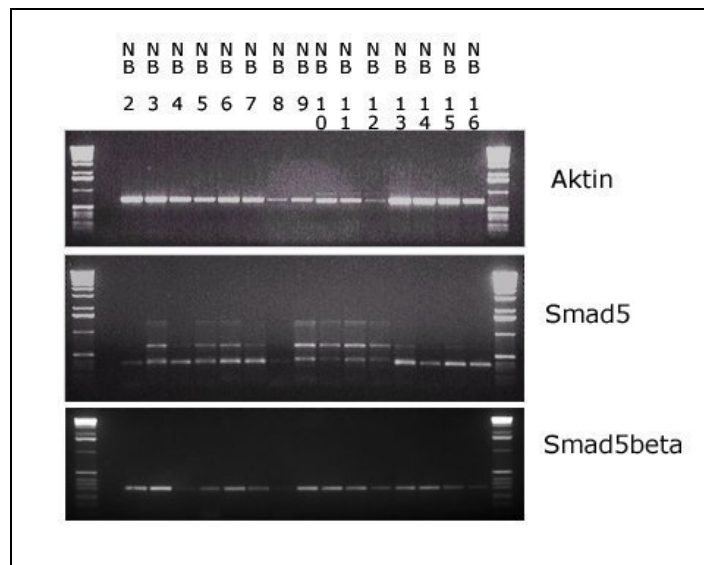


Abb. 14 Repräsentative RT-PCR-Aufnahmen der Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  in Proben von Leukozyten aus dem peripheren Blut gesunder Probanden

#### 4.2.2 Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$ in bei -80 °C gelagerten Leukozytenproben aus dem peripheren Blut gesunder Probanden

Auch in solchen Proben, die als Leukozytenpellet zunächst eingefroren und gelagert worden sind, bevor sie aufgearbeitet wurden ( $n=19$ ), ließ sich neben Smad5 die alternative Spleißvariante Smad5 $\beta$  nachweisen (Abb.15).

Ebenfalls war das Expressionsniveau von Smad5 $\beta$ -mRNA deutlich höher als von Smad5-mRNA. Der Median des Quotienten beider Varianten zueinander liegt in dieser Gruppe bei 13,8 (Minimum 1,1; Maximum 60,4) (Abb.16). Es besteht ein starker Zusammenhang zwischen der Expression von Smad5 und der von Smad5 $\beta$  ( $r=0,898$ ;  $p < 0,001$ , Korrelation nach Pearson).



## Ergebnisse

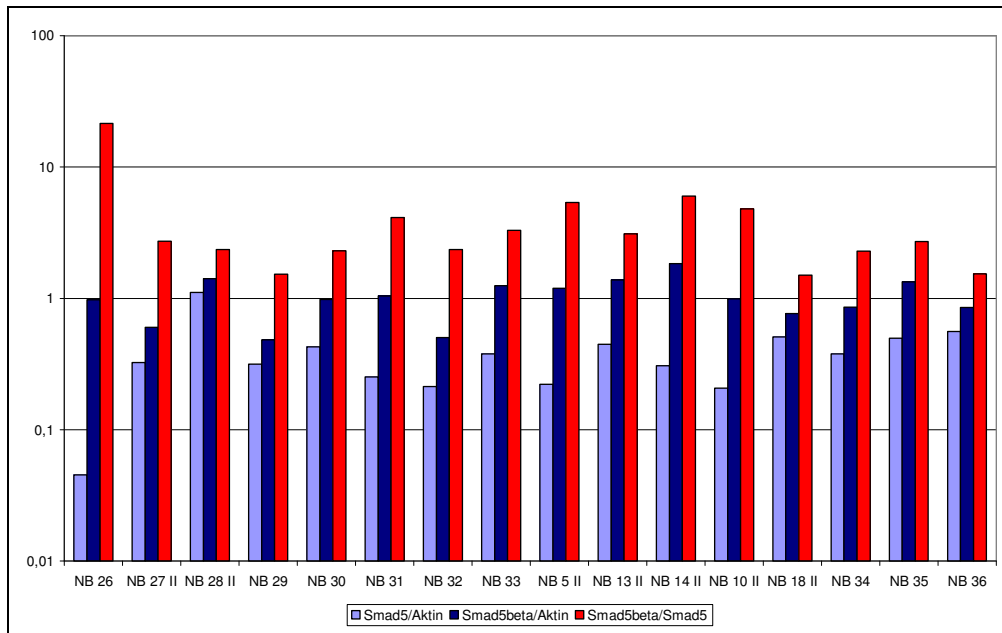


Abb.15 Beispielhafte densitometrische Auswertung einer RT-PCR-Untersuchung der Expression von Smad5 und Smad5β in Proben von Leukozyten des peripheren Blutes gesunder Probanden, die vor der RNA-Isolierung bei -80 °C gelagert wurden

### 4.2.3 Vergleich der Expression von Smad5 und Smad5β in bei -80 °C gelagerten Leukozytenproben und frisch bis zur RNA-Ebene aufgearbeiteten Leukozyten aus dem peripheren Blut gesunder Probanden

Vergleicht man nun die beiden nach dem Zeitpunkt der Aufarbeitung bzw. der Lagerung unterschiedenen Gruppen von Leukozyten aus dem peripheren Blut gesunder Probanden miteinander (Abb.16, Tab.8), so fällt auf, dass sich in beiden Gruppen die Konzentration von Smad5-mRNA deutlich unterscheidet. Während sich die Minima in beiden Gruppen ähneln, weichen sie in den weiteren Maßzahlen stark voneinander ab. So sind in der Gruppe der frisch bis auf RNA-Ebene aufgearbeiteten Proben Median und Mittelwert der Smad5- bzw. Smad5β-Konzentration rund zwei- bis dreimal so groß wie in der vor RNA-Lyse eingefrorenen Gruppe.

Der Unterschied ist statistisch signifikant ( $p = 0,001$ ). Daraus resultiert ein Unterschied im Quotient Smad5β/Smad5, der auf Zehn-Prozent-Niveau statistisch signifikant ist ( $p = 0,075$ ). Die Unterschiede in der Smad5β-Expression sind statistisch nicht signifikant.

## Ergebnisse

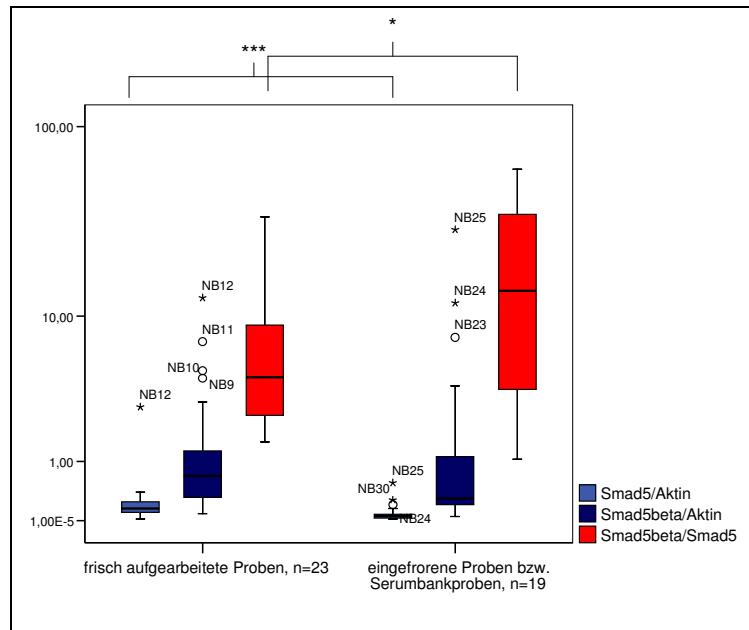


Abb.16 Boxplots der Expression von Smad5 und Smad5β bezogen auf β-Aktin bzw. Smad5β/Smad5 der beiden Gruppen von Leukozytenproben aus dem peripheren Blut gesunder Probanden ermittelt in Real-Time-PCR; \*\*\*  $p < 0,01$  ; \*  $p < 0,1$

Lagemaß	Frisch bis auf RNA-Niveau aufgearbeitete Proben n= 23			Vor RNA-Aufbereitung als Leukozytenpellet eingefrorene Proben n = 19		
	Smad5/ Aktin	Smad5β/ Aktin	Smad5β/ Smad5	Smad5/ Aktin	Smad5β/ Aktin	Smad5β/ Smad5
Minimum	0,020	0,087	1,513	0,021	0,053	1,059
25%-Quartil	0,098	0,303	2,429	0,027	0,185	3,36
Median	0,146	0,678	4,323	0,053	0,296	13,79
Mittelwert	0,282	1,772	6,617	0,098	3,077	20,365
75%-Quartil	0,259	1,304	9,066	0,089	1,257	43,324
Maximum	2,794	12,605	34,065	0,561	29,268	60,433

Tab. 8 Lagemaße aller Leukozytenproben aus dem peripheren Blut gesunder Probanden, unterschieden nach dem Zeitpunkt der RNA-Gewinnung, Werte ermittelt in Real-Time-PCR

Aufgrund dieser Unterschiede zwischen frisch bis zur RNA-Ebene aufgereinigten Proben und solchen, die als Zellpellet in der Serumbank eingefroren wurden, werden diese im Folgenden immer getrennt betrachtet.

#### 4.2.4. Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$ in einzelnen Leukozytenfraktionen des peripheren Blutes gesunder Probanden

Es stellt sich nun die Frage, in welchen Zellpopulationen der Leukozytenfraktion des peripheren Vollblutes die hier untersuchten Spleißvarianten von Smad5 vor allem auftreten. Gibt es dabei Unterschiede in der Expression oder werden beide in allen Zellarten gleich exprimiert? Hierzu wurden wie oben beschrieben in zwei Schritten entweder mit Hilfe einer Dichtegradiententrennung mononukleäre Zellen von granulozytären Zellen abgetrennt oder in einem zweiten Verfahren aus dem Zellpellet mit Hilfe magnetisch markierter Antikörper bestimmte repräsentative und in ausreichendem Maße vorhandene Zellarten abgetrennt. Die so gewonnenen Zellfraktionen wurden auf ihre Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  untersucht.

Wie in den Proben des Vollblutes konnten auch in allen untersuchten leukozytären Zellfraktionen beide mRNA-Varianten mit Hilfe der konventionellen RT-PCR (Abb. 17) als auch mit der quantitativen Real-Time-PCR nachgewiesen werden (Abb.18, 19).

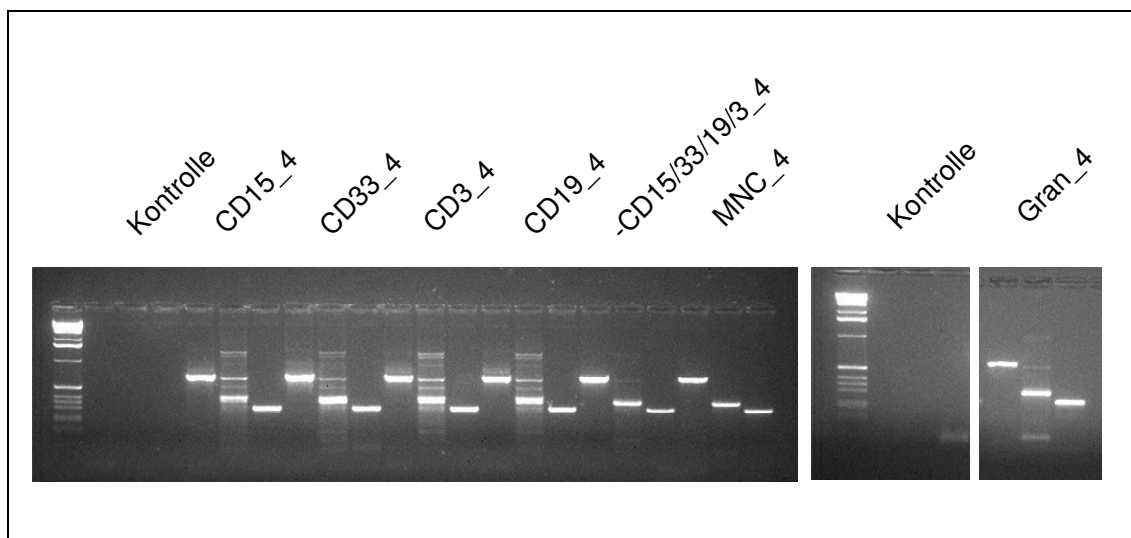


Abb.17 Beispielhafte RT-PCR-Aufnahmen der Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  in einzelnen Zellfraktionen der Leukozyten aus dem peripheren Blut eines gesunden Probanden, abgetragen sind jeweils  $\beta$ -Aktin, Smad5 und Smad5 $\beta$  für eine Probe

## Ergebnisse

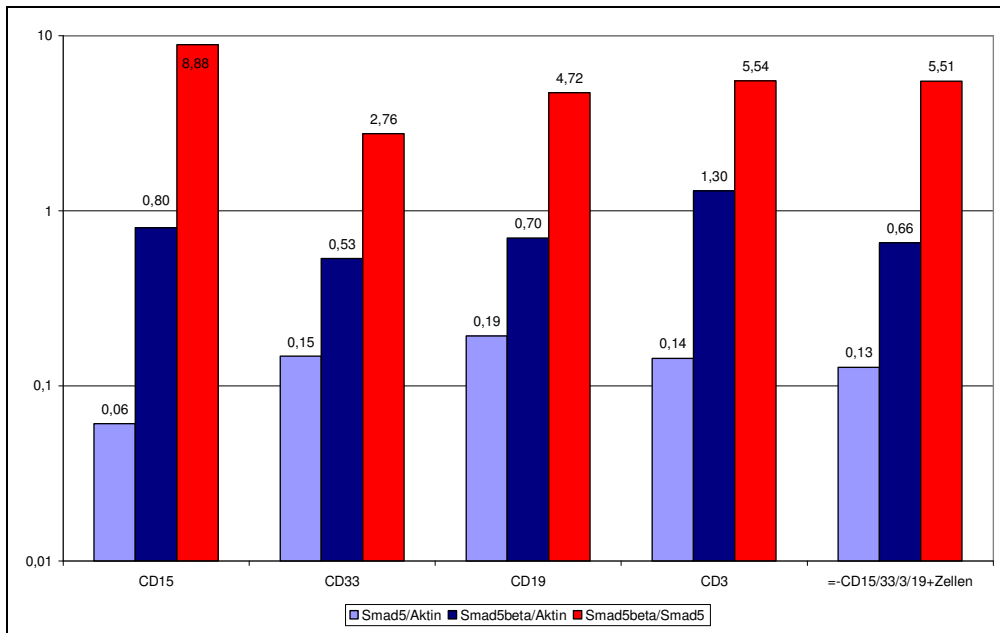


Abb. 18 Mediane aus Real-Time-PCR für die Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  bezogen auf  $\beta$ -Aktin bzw. Smad5 $\beta$  bezogen auf Smad5 für Zellfraktionen von Leukozytenproben sieben gesunder Probanden nach Auftrennung mit Hilfe magnetischer Antikörper

Auch in diesen Experimenten findet sich in Analogie zum Vollblut in der Real-Time-PCR mehr Smad5 $\beta$ -mRNA als Smad5-mRNA. Allein bei den mononukleären Zellen (MNC) finden sich im geometrischen Mittel Smad5 in höheren Konzentrationen (Abb. 18 und 19). Dabei fällt auf, dass in den beiden Fraktionen, in denen sich überwiegend Neutrophile Granulozyten befinden („CD15“, d.h. CD15 $^{+}$ -Zellen aus der Auftrennung mit Hilfe magnetisch markierter Antikörper gegen das CD15-Antigen und „Gran“, d.h. Neutrophile Granulozyten aus dem Unterstand der Dichtegradientenzentrifugation), jeweils Smad5 geringer exprimiert und Smad5 $\beta$  höher exprimiert ist, als in den Mononukleären Zellen, die entweder als Zellschicht nach der Dichtegradientenzentrifugation („MNC“) oder aber als Einzelzellfraktionen (jeweils CD33 $^{+}$ , CD19 $^{+}$  oder CD3 $^{+}$ -Zellen) nach der Auftrennung mit Hilfe magnetisch markierter Antikörper, vertreten sind. Der Quotient aus den beiden untersuchten RNA-Varianten ist somit für die Neutrophilen Granulozyten größer als für die Mononukleären Zellen. Schaut man die untersuchten Zellgruppen CD33 $^{+}$ -, CD19 $^{+}$  und CD3 $^{+}$ -Zellen der Untergruppe „Mononukleäre Zellen“ an, so ergibt sich ein eher ausgeglichenes Bild. Allein bei den CD33 $^{+}$ -Zellen scheint Smad5 $\beta$  etwas weniger exprimiert zu werden. Trägt man die ermittelten Mediane auf den Median aller frisch aufgearbeiteten Proben der Leukozyten aus dem peripheren Blut gesunder Probanden ab (VB), verdeutlichen sich die genannten Unterschiede (Abb.20, 21).

## Ergebnisse

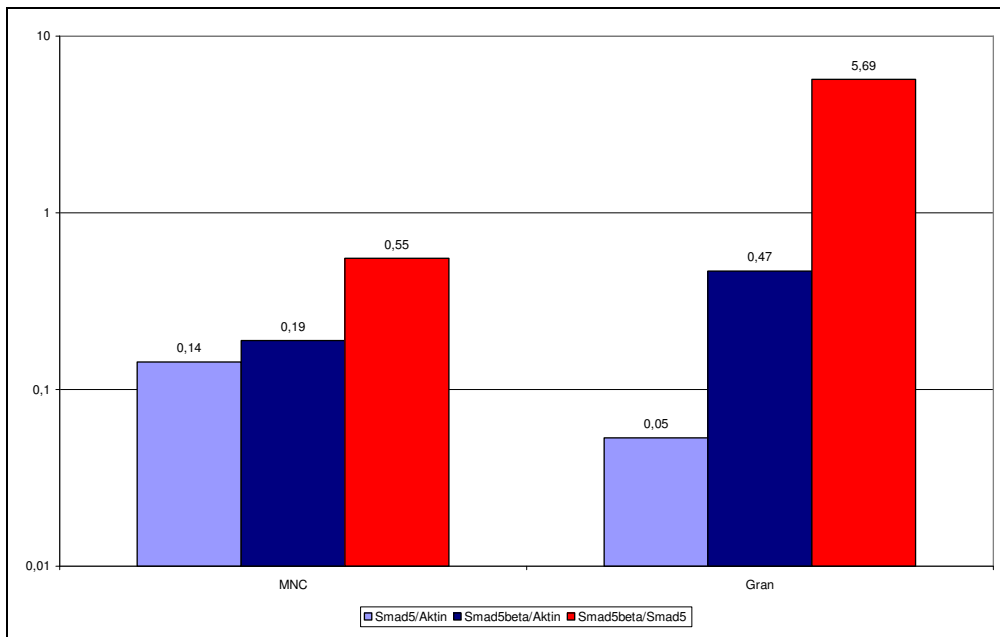


Abb. 19 Mediane aus Real-Time-PCR für die Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  bezogen auf  $\beta$ -Aktin bzw. Smad5 $\beta$  bezogen auf Smad5 in Zellfraktionen von sieben Leukozytenproben gesunder Probanden nach Auftrennung mit Hilfe der Dichtegradientenfractionierung, MNC - Mononukleäre Zellen, Gran - Neutrophile Granulozyten

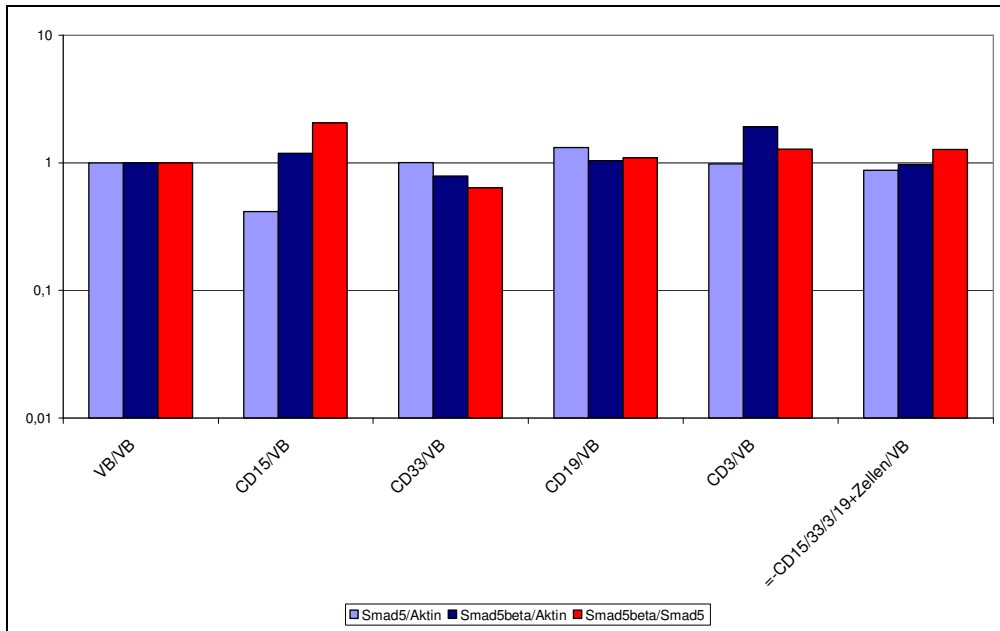


Abb. 20 Mediane der Werte aus Real-Time-PCR für Smad5 und Smad5 $\beta$  bezogen auf  $\beta$ -Aktin bzw. Smad5 $\beta$  bezogen auf Smad5 aus Leukozytenfraktionierung von Leukozytenproben sieben gesunder Probanden mit magnetisch markierten Antikörpern bezogen auf Leukozyten des peripheren Blutes von 23 gesunden Probanden

Für die statistische Auswertung der verbundenen Stichproben wurde als Globaltest der Test nach Friedman verwandt. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die ermittelten Unterschiede für Smad5 $\beta$ / $\beta$ -Aktin auf Zehn-Prozent-Niveau statistisch signifikant sind ( $p=0,06$ ). Für den Quotienten von Smad5 $\beta$  und Smad5 wurde der Unterschied auf Fünf-Prozent-Niveau signifikant getestet ( $p=0,016$ ). Allerdings konnte mit Hilfe der Einzeltestung nach Wilcoxon kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Zellgruppen gefunden werden.

Auch in dieser Experimentengruppe konnte ein statistischer Zusammenhang zwischen der Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  ermittelt werden ( $r=0,535$ ;  $p=0,000$ ; Korrelation nach Pearson).

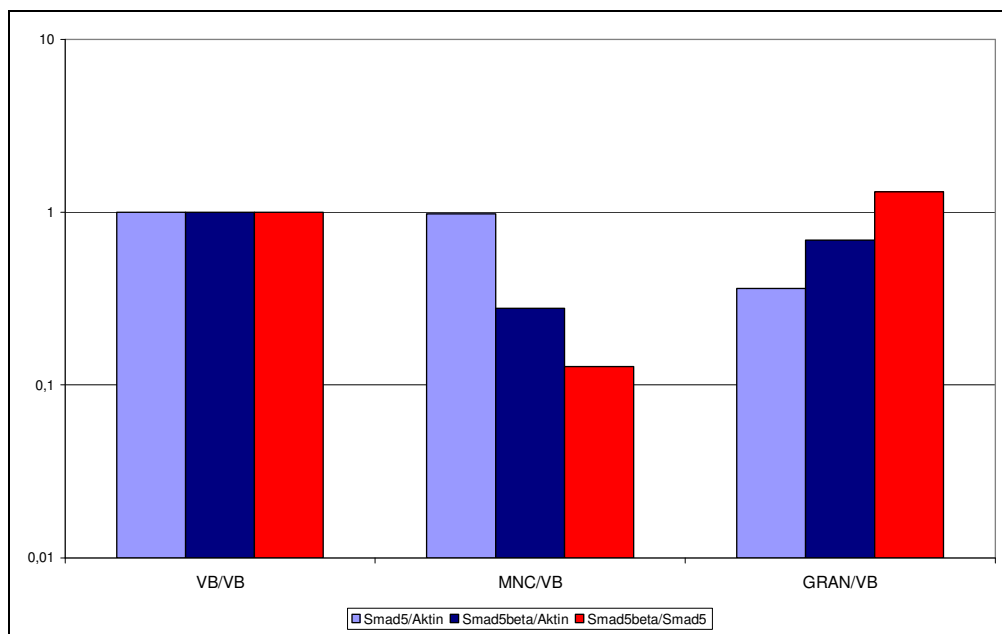


Abb.21 Mediane der Werte aus Real-Time-PCR für Smad5 und Smad5 $\beta$  bezogen auf  $\beta$ -Aktin bzw. Smad5 $\beta$  bezogen auf Smad5 aus Leukozytenfraktionierung von Leukozytenproben sieben gesunder Probanden mit Dichtegradientenzentrifugation bezogen auf Leukozyten des peripheren Blutes von 23 gesunden Probanden

### 4.4 Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$ im peripheren Blut von an AML erkrankten Patienten

Diese aus der Leukozyten- und Serumbank des Onkologischen Forschungslabors entnommenen Proben wurden jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten, d.h. bei Diagnosestellung, unter Chemotherapie, vor und nach Knochenmark- oder Stammzelltransplantation sowie in der ambulanten Nachkontrolle gewonnen. In allen Proben

## Ergebnisse

konnten mit konventioneller RT-PCR (Abb. 22) als auch mit Real-Time-PCR (Abb. 23) beide Smad5-Spleißvarianten gefunden werden.

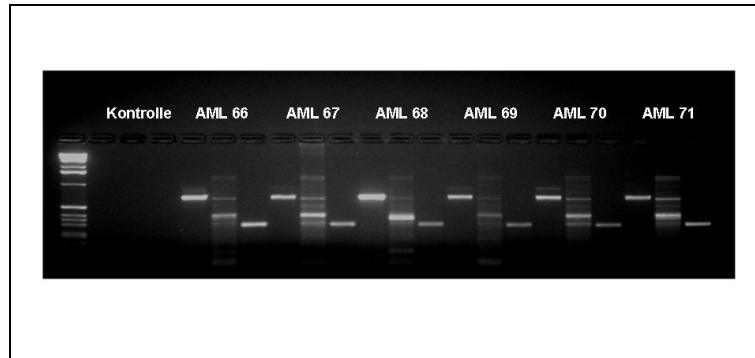


Abb. 22 Beispielhafte RT-PCR für die Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  im peripheren Blut von sechs Patienten mit AML in unterschiedlichen Behandlungsphasen, abgetragen sind jeweils für einen Patienten  $\beta$ -Aktin, Smad5 und Smad5 $\beta$  nebeneinander

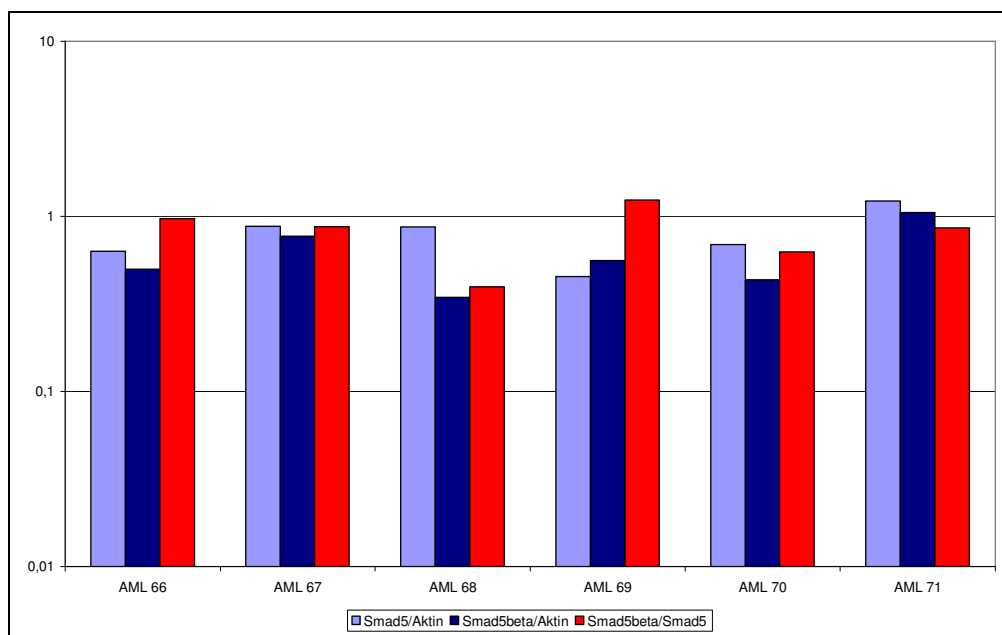


Abb. 23 Beispielhafte densitometrische Auswertung einer RT-PCR für die Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  im peripheren Blut von sechs Patienten mit AML in unterschiedlichen Behandlungsphasen, abgetragen sind jeweils für einen Patienten  $\beta$ -Aktin, Smad5 und Smad5 $\beta$

In der Real-Time PCR wurden ebenfalls für alle untersuchten Proben höhere Smad5 $\beta$ -Expressionslevel ermittelt als für Smad5. Die Expression von Smad5 korreliert auch in dieser Probengruppe mit der von Smad5 $\beta$  ( $r = 0,746$ ;  $p < 0,01$ , Korrelation nach Spearman).

Für die statistische Auswertung wurden 19 klinische Daten erhoben (Tab.9). Unter diesen Daten konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Expression der beiden Smad5-RNA-Varianten für die primäre oder sekundäre AML und ihre Herkunft aus einem MDS, die Anzahl der Blasten im peripheren Blut, für die FAB-Klassifikation, die Anzahl der segmentkernigen Neutrophilen Granulozyten, der Lymphozyten sowie der Monozyten, in Abhängigkeit von der Hämoglobinkonzentration oder der Thrombozytenzahl, für den klinischen Parameter Gerinnungsstörung, für den Verlauf oder den Überlebensstatus gefunden werden.

Allerdings zeigen sich leichte Zusammenhänge zwischen Smad5 $\beta$ /Aktin bzw. Smad5 $\beta$ /Smad5 und der Anzahl der segmentkernigen Neutrophilen Granulozyten (in Prozent) ( $r = 0,349$ ;  $p < 0,05$  bzw.  $r = 0,284$ ;  $p < 0,05$ ; Korrelation nach Spearman).

Für vier der untersuchten klinischen Parameter konnten signifikante Unterschiede in den Expressionen konstatiert werden. Besonders auffällig sind die Unterschiede der untersuchten Expressionen in Abhängigkeit von der Station, von der die Patientenprobe stammt. Die ermittelten Unterschiede sind global für den Quotienten Smad5 $\beta$ /Aktin ( $p = 0,05$ ) als auch für Smad5 $\beta$  bezogen auf Smad5 ( $p < 0,001$ ) signifikant (Kruskal-Wallis-Test). Insbesondere die bestimmten Werte von Smad5 $\beta$  in den Proben der Station 9 sind kleiner als in denen, die von der Station 15 kommen ( $p = 0,021$ ; Mann-Whitney-Test). Die Quotienten von Smad5 $\beta$  zu Smad5 unterscheiden sich ebenfalls signifikant sowohl für die Proben von der Station 9 und der Poliklinik von denen der Station 15 ( $p < 0,01$ , Mann-Whitney-Test). Der Median des Quotienten ist bei den Proben am größten, die von der Knochenmarktransplantationsstation 15 kommen. Für die anderen beiden Herkunftsstationen, Station 9 und Poliklinik, ist der Median von Smad5/Smad5 $\beta$  in etwa gleich (Abb.24).

Für die prognostisch bedeutsame Altersgrenze 60 Jahre wurde ein statistisch signifikanter Unterschied im Verhältnis von Smad5 $\beta$  zu Smad5 gefunden ( $p = 0,003$ ). Der Quotient für Patienten unter 60 ist im Median ca. dreimal so groß, wie der der Patienten über 60 (Abb.25). Untersucht man diesen Unterschied weiter in den Untergruppen der Stationen, so findet man ihn ebenfalls in den Proben der Poliklinik ( $p < 0,05$ ).



## Ergebnisse

Abnahme (Jahr)	1997 5,6% (2/54) 1998 27,8% (15/54) 1999 16,6% (9/54)	2000 24,1% (13/54) 2001 13% (7/54) 2002 1,9% (1/54)	2003 11,1% (6/54) 2004 1,9% (1/54)
Geschlechtsverteilung	weiblich 51,9% (28/54)	männlich 48,1% (26/54)	
Durchschnittsalter	51,7 Jahre (19-84 Jahre)		
Altersgrenze 60	<60Jahre 68,5% (37/54) >60 Jahre 31,5% (17/54)		
Ort der Probenentnahme	Station 9 22,2% (12/54) Station 15/KMT 46,3% (25/54) Hämatologische Poliklinik 31,5% (17/54)		
Primäre oder sekundäre AML	Primäre AML 75,9% (41/54)	Sekundäre AML 24,1% (13/54)	
Transformation aus MDS	AML aus MDS 20,4% (11/54) AML nicht aus MDS 77,8% (42/54)		
Leukozyten im Blut	< 4,4Gpt/l 46,3% (25/54) 4,4-11,3Gpt/l 38,9% (21/54) >11,3Gpt/l 9,3% (5/54) >100Gpt/l 5,6% (3/54)		
Hämoglobinkonzentration	< 8,7mmol/l 90,7% (49/54) 8,7-10,9mmol/l 7,4% (4/54) >10,9mmol/l 0 fehlend 1,9% (1/54)		
Thrombozyten im Blut	<30Gpt/l 16,7% (9/54) 30-150Gpt/l 48,1% (26/54) 150-360Gpt/l 33,3% (18/54) >360Gpt/l 1,9% (1/54)		
Gerinnungsstörung (klinisch)	Keine 72,2 % (39/54) Vorhanden 16,7% (9/54) fehlend 11,1% (6/54)		
FAB-Klassifikation der AML	M1 18,5% (10/54) M2 33,3% (18/54) M3 3,7% (2/54) M3v 3,7% (2/54) M4 18,5% (10/54) M4Eo 5,6% (3/54) M5 7,4% (4/54) M6 3,7% (2/54) unbekannt 5,6% (3/54)		
Karyotyp	Unverändert 27,8% (15/54) Mit Veränderungen 40,7% (22/54) Unbekannt 31,5% (17/54)		
Überlebensstatus	Verstorben 50% (27/54) Lebend oder unbekannt 50% (27/54)		
Rezidiv	Mit Rezidiv im Verlauf 24,1% (13/54) Ohne Rezidiv oder Unbekannt 75,9% (41/54)		
Segmentkernige im Blut bei Probenabnahme	<40% 42,6% (23/54) 40-75% 46,3% (25/54) >75% 3,7% (2/54) fehlend 7,4% (4/54)		
Lymphozyten im Blut bei Probenabnahme	>20% 42,6% (23/54) 20-40% 31,5% (17/54) >40% 20,4% (11/54) fehlend 5,6% (3/54)		
Monozyten im Blut bei Probenabnahme	<2% 13% (7/54) 2-8% 38,9% (21/54) >8% 42,6% (23/54) fehlend 5,6% (3/54)		
Blasten im Blut bei Probenabnahme	Keine 46,8% (31/54) 1-50% 24,1% (13/54) >50% 11,1% (6/54)		

Tab. 9 Daten des Untersuchungskollektives „eingefrorene AML-Proben aus Serum- und Leukozytenbank“

## Ergebnisse

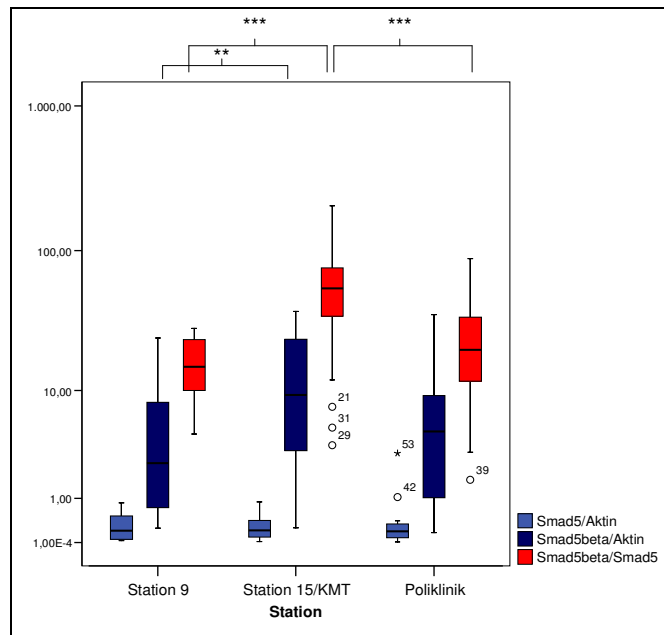


Abb.24 Boxplots der Expression von Smad5 und Smad5β bezogen auf β-Aktin bzw. Smad5β/ Smad5 aus Real-Time-PCR in Abhängigkeit von der Proben-einsendenden Station, \*\* p<0,05, \*\*\* p<0,01

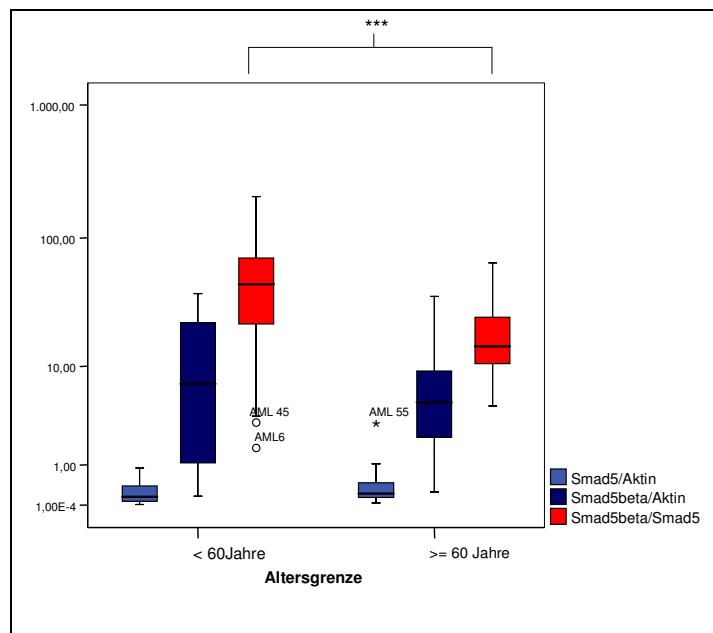


Abb. 25 Boxplots der Expression von Smad5 und Smad5β bezogen auf β-Aktin bzw. Smad5β/Smad5 in Abhängigkeit von der prognostisch bedeutsamen Altersgrenze 60 Jahre, \*\*\* p<0,01

In den Proben der Station 9 lässt sich dieser Unterschied nicht nachweisen. In dieser Untergruppe unterscheidet sich allerdings der Wert Smad5β/Aktin signifikant auf Zehn-Prozent-Niveau ( $p=0,074$ ) und ist hier im Median bei den über 60-jährigen Pa-

tienten rund dreimal so groß wie bei den unterhalb dieser Altersgrenze befindlichen. In der Untergruppe Station 15 gibt es keine Patienten, die zum Zeitpunkt der Probenabnahme älter als 60 Jahre waren.

Ebenfalls wurden signifikante Unterschiede der bestimmten RNA-Varianten in Abhängigkeit von der Leukozytenkonzentration ermittelt. In dieser Gruppe waren die ermittelten Unterschiede für den Parameter Smad5 bezogen auf  $\beta$ -Aktin auf Zehn-Prozent-Niveau ( $p=0,086$ , Kruskal-Wallis-Test) signifikant. Dies trifft ebenfalls auf Smad5 $\beta$ /Smad5 zu ( $p=0,059$ , Kruskal-Wallis-Test). Im Untertest nach Mann-Whitney wurden die signifikanten Unterschiede für Smad5/ $\beta$ -Aktin und Smad5 $\beta$ /Smad5 zwischen den Gruppen „Leukozytenkonzentration < 4,4 Gpt/l“ und „Leukozytenkonzentration zwischen 4,4 und 11,3 Gpt/l“ (klinischer Normbereich) gefunden ( $p=0,039$  bzw.  $p=0,025$ ). Dabei ist die Smad5-Konzentration der leukopenischen Proben kleiner als die der Proben mit Leukozyten im Normbereich. Dagegen ist der Quotient aus Smad5 $\beta$ /Smad5 in der letzteren größer als in den erstgenannten Proben (Abb. 26).

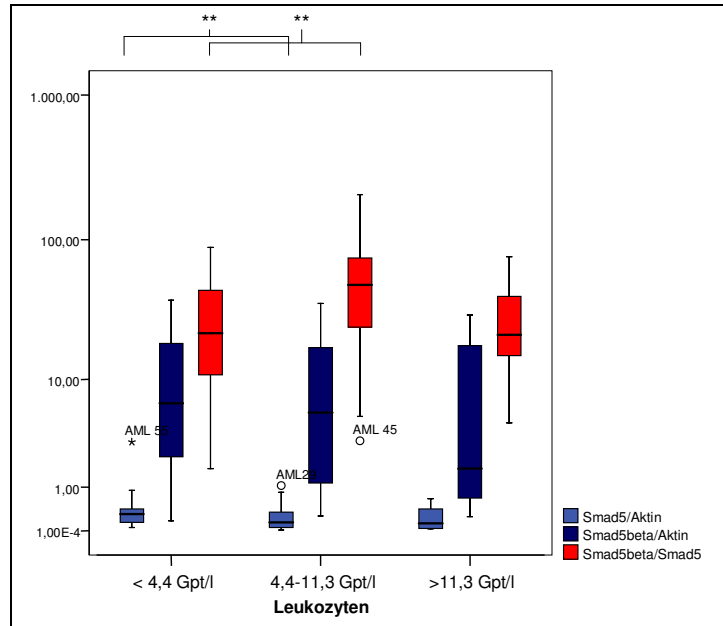


Abb.26 Boxplots der Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  bezogen auf  $\beta$ -Aktin bzw. Smad5 $\beta$ /Smad5 in Abhängigkeit von der Leukozytenkonzentration der gemessenen Blutprobe, Jahre, \*\*  $p<0,05$

Es wurde auch ein signifikanter Unterschied in der Smad5-Konzentration genormt auf  $\beta$ -Aktin in Abhängigkeit vom Karyotyp festgestellt (Abb.27). Dieser bezieht sich

## Ergebnisse

auf die beiden Untergruppen mit bekanntem Karyotyp. So ist der bestimmte Wert in der Untergruppe mit Veränderungen im Karyotyp kleiner als bei unverändertem Karyotyp ( $p=0,018$ , Mann-Whitney-Test).

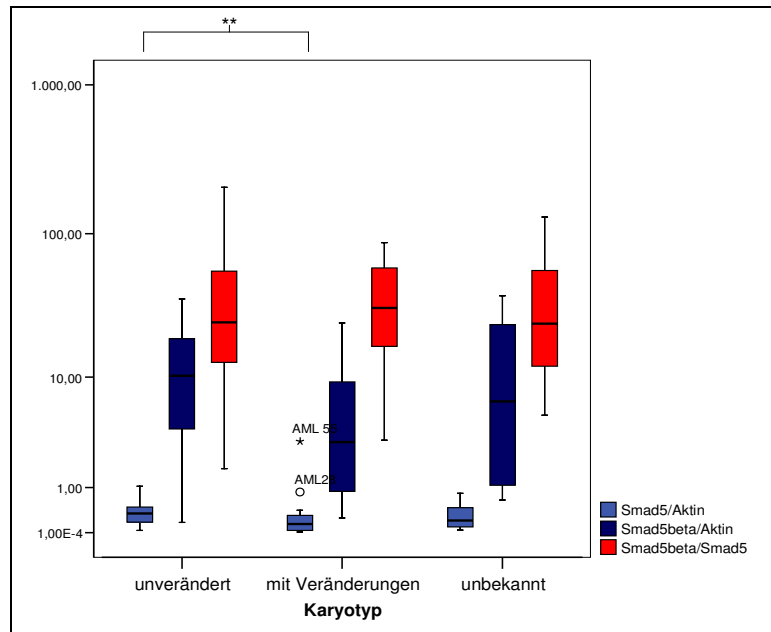


Abb.27 Boxplots der Expression von Smad5 und Smad5β bezogen auf β-Aktin bzw. Smad5β/Smad5 in Abhängigkeit von Veränderung im Karyotyp, Jahre, \*\*  $p<0,05$

### 4.5 Expression von Smad5 und Smad5β in Knochenmarksproben von an AML erkrankten Patienten

Für die Untersuchungen der Expression an Knochenmarksproben von Patienten die an AML erkrankt sind, wurden sowohl eigenständig aufgearbeitete, frische Knochenmarksproben, als auch durch Dr. S. Scholl, Klinik für Innere Medizin II, zur Verfügung gestellte, bereits bis zur RNA aufgearbeitete, aber vor der Aufarbeitung als Zellpellet eingefrorene Knochenmarksproben verwandt. Leider besteht für letztere keine eigenständige Kontrollgruppe.

#### 4.5.1 Expression von Smad5 und Smad5β in eingefrorenen Knochenmarksproben von an AML erkrankten Patienten bei Diagnosestellung

Smad5 und die alternative Spleißvariante waren ebenfalls in allen vor der Aufarbeitung eingefrorenen Knochenmarksproben nachweisbar. Smad5 konnte in einigen

## Ergebnisse

dieser Proben allerdings nur schwach mit deutlichen Artefakten über die konventionelle RT-PCR gezeigt werden (Abb. 28).

In der Real-Time PCR wurden wie in den zuvor untersuchten Patientenproben für alle untersuchten Proben höhere Smad5 $\beta$ -Expressionslevel ermittelt als bei Smad5 (Abb. 29). Allerdings konnte statistisch keine Korrelation zwischen der Expression von Smad5 mit der von Smad5 $\beta$  gezeigt werden.

Die statistische Auswertung wurde anhand von 14 klinischen Parametern durchgeführt (Tab.10). Hierbei wurden hinsichtlich des Expressionsmusters keine statistisch signifikanten Unterschiede für die einzelnen klinischen Daten gefunden.

Geschlechtsverteilung	weiblich 62,5% (20/32)	männlich 37,5% (12/32)
Durchschnittsalter	56,8 Jahre (22-84 Jahre)	
Altersgrenze 60	<60Jahre 53,1% (17/32)	>60 Jahre 43,8% (14/32)
Primäre oder sekundäre AML	Primäre AML 65,6% (21/32)	Sekundäre AML 28,1% (9/32) Fehlend 6,3% (2/32)
Transformation aus MDS	AML aus MDS 21,9% (9/32)	AML nicht aus MDS 71,9% (23/32) Fehlend 6,3% (2/32)
Leukozyten im Blut	< 4,4Gpt/l 15,6% (5/32)	>11,3Gpt/l 46,9% (15/32) 4,4-11,3Gpt/l 12,5% (4/32) >100Gpt/l 21,9% (7/32) Fehlend 3,1% (1/32)
Hämoglobinkonzentration	< 8,7mmol/l 100% (32/32)	>10,9mmol/l 0 8,7-10,9mmol/l 0
Thrombozyten im Blut	<30Gpt/l 18,8% (6/32)	150-360Gpt/l 71,9% (23/32) 30-150Gpt/l 6,3% (2/32) >360Gpt/l 0 Fehlend 3,1 (1/32)
Gerinnungsstörung (klinisch)	Keine 71,9 % (23/32)	Vorhanden 21,9% (7/32) fehlend 6,3% (2/32)
FAB-Klassifikation der AML	M0 6,3% (2/32)	M1 25,0% (8/32) M2 31,3% (10/32) M3v 3,1% (1/32) M4 12,5% (4/32) M5 6,3% (2/32) M6 3,1% (1/32) unbekannt 12,5% (4/32)
Karyotyp	Unverändert 15,6% (5/32)	Unbekannt 31,3% (10/32) Mit Veränderungen 53,1% (17/32)
Überlebensstatus	Verstorben 40,6% (13/32)	Lebend oder unbekannt 59,4% (19/32)
Blasten im KM bei Probenabnahme	<50% 15,6% (5/32)	>50% 75,0% (24/32) Unbekannt 9,4% (3/32)

Tab. 10 Statistische Daten des Untersuchungskollektives „eingefrorene KM-Proben

## Ergebnisse

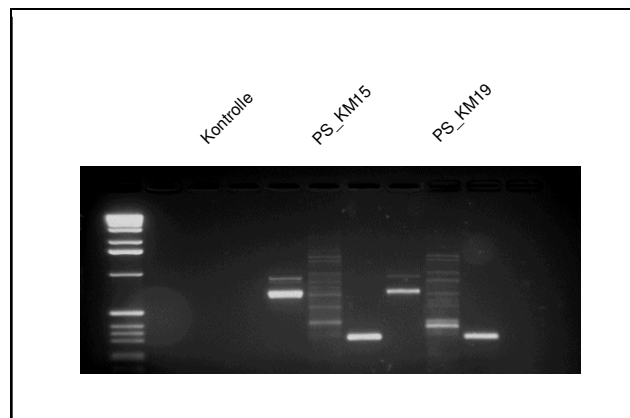


Abb. 28 Repräsentatives RT-PCR-Ergebnis für die Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  im KM von Patientenproben, welche vor RNA-Isolation eingefroren gelagert wurden, abgetragen sind jeweils  $\beta$ -Aktin, Smad5 und Smad5 $\beta$  nebeneinander für eine Probe

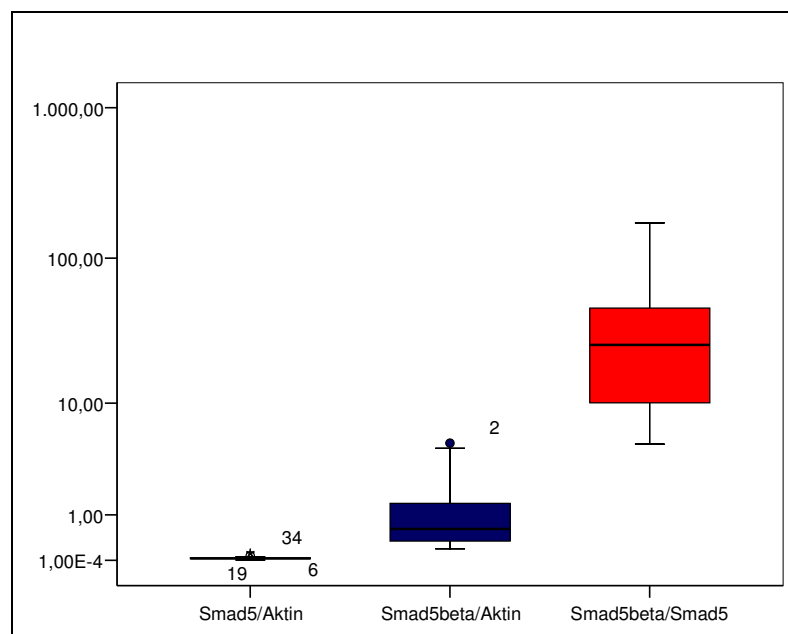


Abb.29 Boxplots der Werte ermittelt in Real-Time-PCR für die Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  bezogen auf  $\beta$ -Aktin bzw. Smad5 $\beta$ /Smad5 von vor der Aufarbeitung eingefrorenen KM-Proben von Patienten bei Diagnosestellung AML

### 4.5.2 Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$ in frisch aufgearbeiteten Knochenmarksproben von an AML erkrankten Patienten bei Diagnosestellung

Für die jeweils eigenständig sofort bis auf RNA-Ebene aufgearbeiteten Proben wurden zwei Kontrollgruppen eingeführt. Diese enthalten jeweils Proben von Patienten,

die entweder an einer AML erkrankt waren und sich nach Therapie im Stadium der kompletten Remission befinden bzw. in einer zweiten Gruppe solche Proben von Patienten, welche an einer anderen hämatologischen Erkrankung ohne einen Befall des Knochenmarkes leiden.

Die gesuchten RNA konnten in allen Proben dieser drei Gruppen mit Hilfe der konventionellen RT-PCR (Abb. 30) als auch mit der Real-Time-PCR gezeigt werden.

In der Real-Time PCR wurden ebenfalls für alle untersuchten Proben höhere Smad5 $\beta$ -Expressionslevel ermittelt als bei Smad5. In diesem Kollektiv konnte ebenfalls eine stark positive Korrelation der Smad5 $\beta$ -Expression mit der von Smad5 gefunden werden ( $r = 0,733$ ;  $p < 0,001$ , Korrelation nach Spearman).

Die statistische Auswertung erfolgte anhand von 16 klinischen Parametern (Tab. 11).

Keine statistisch signifikanten Unterschiede konnten für die Expression der bestimmten mRNA bzw. für deren als Hilfsparameter verwendeten Quotienten daraus und dem Geschlecht, der Transformation der AML aus einem MDS, dem Hämoglobinwert im Blut, einem Vorhandensein einer Gerinnungsstörung, der FAB-Einordnung der Erkrankung, dem Karyotyp bzw. dem Überlebensstatus gefunden werden.

Signifikante Unterschiede in der Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  lassen sich zwischen den gewählten Patientengruppen finden. Hier sind die Unterschiede im Globaltest für die Quotienten Smad5/ $\beta$ -Aktin bzw. Smad5 $\beta$ /Smad5 auf Zehn-Prozent-Niveau ( $p=0,084$  bzw.  $0,068$ ) und für Smad5 $\beta$ / $\beta$ -Aktin auf Fünf-Prozent-Niveau ( $p=0,036$ ) signifikant. Untersucht man die einzelnen Gruppen nach dem statistischen Verfahren von Mann und Whitney näher, so findet man die signifikanten Unterschiede für Smad5 $\beta$ /Smad5 zwischen den Gruppen „AML bei Diagnosestellung“ und „Nicht-AML“ ( $p=0,022$ ) wieder. Der Quotient in der erstgenannten Gruppe ist größer als in letzterer. In der Gruppe „AML bei Diagnosestellung“ ist sowohl Smad5 als auch Smad5 $\beta$  in größerer Konzentration zu finden als in der Gruppe „AML in Remission“. Diese Unterschiede sind statistisch signifikant ( $p=0,013$  jeweils) (Abb. 31). Die Gruppen „AML in Remission“ und „Nicht-AML“ unterscheiden sich untereinander nicht signifikant in ihrem Expressionsmuster.

## Ergebnisse

Art der Probe	Probe AML bei Diagnosestellung	58,8% (20/34)
	Probe AML in kompletter Remission	20,6% (7/34)
	Probe Nicht-AML-Erkrankung ohne KM-Befall	20,6% (7/34)
Geschlechtsverteilung	weiblich 55,9% (19/34)	männlich 44,1% (15/34)
Durchschnittsalter	56,21 Jahre (22-76 Jahre)	
Altersgrenze 60	<60Jahre 61,8% (21/34)	>60 Jahre 38,2% (13/34)
Primäre oder sekundäre AML	Primäre AML 76,5% (26/34)	Sekundäre AML 5,6% (2/34) Fehlend 17,6% (6/34)
Transformation aus MDS	AML aus MDS 8,8% (3/34)	AML nicht aus MDS 73,5% (25/34) Fehlend 17,6% (6/34)
Leukozyten im Blut	< 4,4 Gpt/l 23,5% (8/34)	>11,3Gpt/l 35,3% (12/34) 4,4-11,3 Gpt/l 32,4% (11/34) >100Gpt/l 8,8% (3/34)
Hämoglobinkonzentration	< 8,7mmol/l 97,1% (33/34)	8,7-10,9mmol/l 2,9% (1/34) >10,9mmol/l 0
Thrombozyten im Blut	<30Gpt/l 29,4% (10/34)	150-360Gpt/l 14,7% (5/34) 30-150Gpt/l 55,9% (19/34) >360Gpt/l 0
Gerinnungsstörung	Keine 94,1 % (32/34)	Vorhanden 5,9% (2/34)
FAB-Klassifikation der AML	M0 5,9% (2/34)	M3v 2,9% (1/34)
	M1 20,6% (7/34)	M4 5,9% (2/34)
	M2 23,5% (8/34)	M6 8,8% (3/34)
	M3 5,9% (2/34)	andere 26,5% (9/34)
Karyotyp	Unverändert 17,6% (6/34)	Unbekannt 52,9% (18/34) Mit Veränderungen 29,4% (10/34)
Überlebensstatus	Verstorben 5,9% (2/34)	Lebend oder unbekannt 94,1% (32/34)
Blasten im KM bei Probenabnahme (MW 83%)	Normozellulär 41,2 % (14/34)	<83% Blasten 26,5% (9/34) >83% Blasten 32,4% (11/34)
CD13+ Zellen im KM	Bestimmt 64,7% (22/34)	Fehlend 35,3% (12/34)
CD33+Zellen im KM	Bestimmt 67,6% (23/34)	Fehlend 32,4% (11/34)
CD34+-Zellen im KM	Bestimmt 67,6% (23/34)	Fehlend 32,4% (11/34)

Tab. 11 Statistische Daten des Untersuchungskollektives „frisch aufgearbeitete KM-Proben“



## Ergebnisse

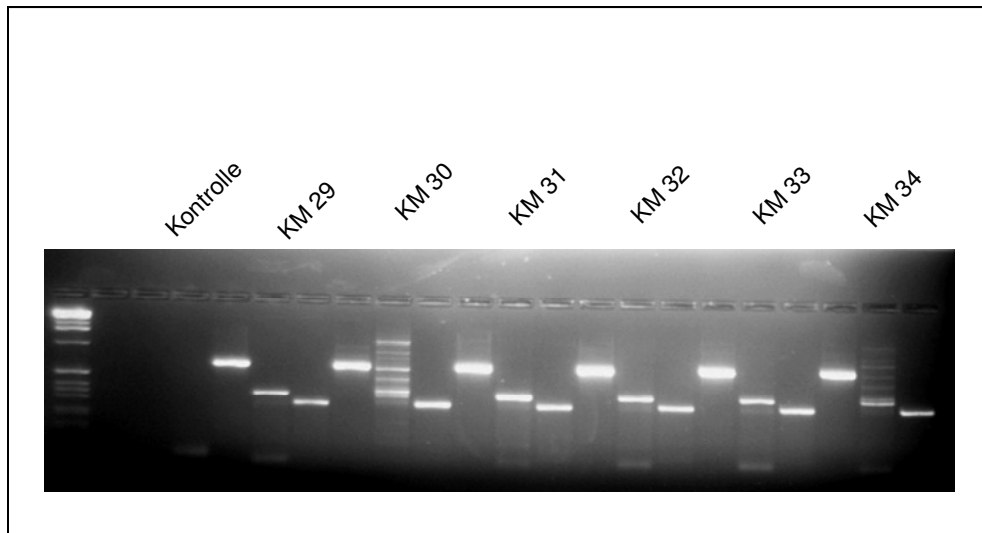


Abb. 30 Repräsentatives RT-PCR-Ergebniss für die Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  im KM von Patientenproben, welche frisch bis auf RNA-Ebene aufgearbeitet wurden, abgetragen sind jeweils  $\beta$ -Aktin, Smad5 und Smad5 $\beta$  nebeneinander für eine Probe

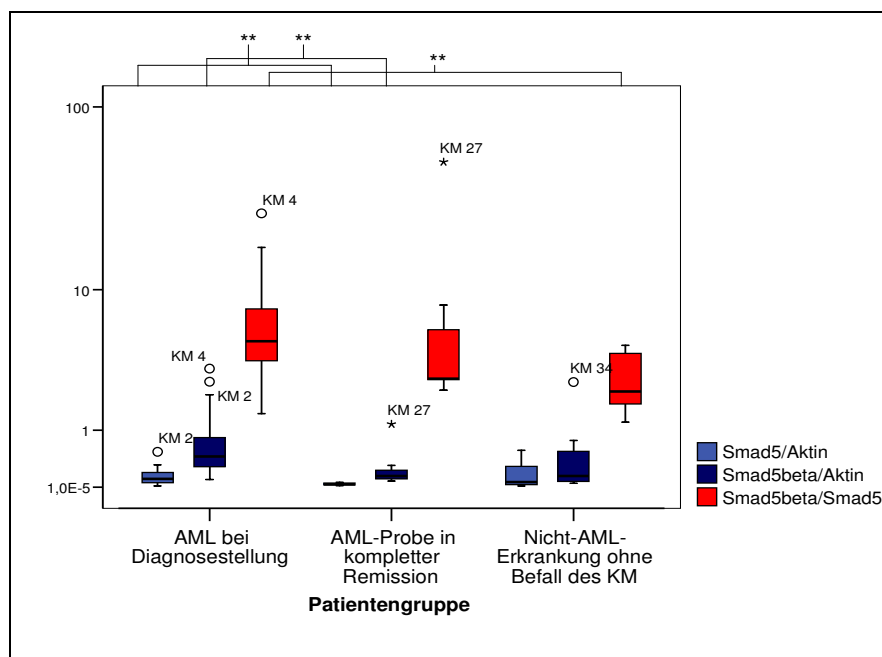


Abb. 31 Boxplots der Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  bezogen auf  $\beta$ -Aktin bzw. Smad5 $\beta$ /Smad5 aus Real-Time-PCR in Abhängigkeit von der Patientengruppe, \*\*  $p < 0,05$

Ebenfalls finden sich signifikante Unterschiede in den untersuchten Expressionen in Abhängigkeit vom Mittelwert der in den Proben befindlichen Blasten. Die Unterteilung der Proben erfolgte in normozelluläre Knochenmarksproben und solche Proben, die eine erhöhte Anzahl von Blasten aufweisen. Letztere Gruppe wurde zur besseren Anschaulichkeit anhand des ermittelten Median der Blastenzahl nochmals unterteilt in eine Gruppe mit weniger als 83% oder aber mehr als 83% bzw. eine subtotale

Durchsetzung mit Blasten. Hier finden sich im Kruskal-Wallis-Test hochsignifikante Unterschiede für Smad5 $\beta$ / $\beta$ -Aktin ( $p=0,006$ ) und signifikante Unterschiede auf Zehn-Prozent-Niveau für Smad5 bezogen auf  $\beta$ -Aktin ( $p=0,066$ ).

Betrachtet man die einzelnen Gruppen näher, findet man im Vergleich der Gruppen mit normozellulärem Knochenmark bzw. mehr als 83% Blasten im Knochenmark einen signifikanten Unterschied auf Ein-Prozent-Niveau für die Expression der alternativen Spleißvariante Smad5 $\beta$  ( $p=0,004$ ). Smad5 $\beta$  wird in letzterer Gruppe vermehrt exprimiert (Median 4,952 versus 2,735). Auch für Smad5 und den Quotienten aus Smad5 $\beta$  und Smad5 sind der Median und die Spannweite in dieser Gruppe größer als in der mit normozellulärem Knochenmark. Der Unterschied ist auf Fünf-Prozent-Niveau für die Expression von Smad5 ( $p=0,038$ ) und auf Zehn-Prozent-Niveau für den Quotienten aus Smad5 $\beta$  und Smad5 ( $p=0,075$ ) signifikant (Abb. 32).

Im Vergleich der Gruppen mit weniger als 83% und mehr als 83% Blasten im Knochenmark sind die Unterschiede zwischen Smad5 ( $p=0,067$ ) bzw. Smad5 $\beta$  ( $p=0,012$ ) signifikant (Abb. 33).

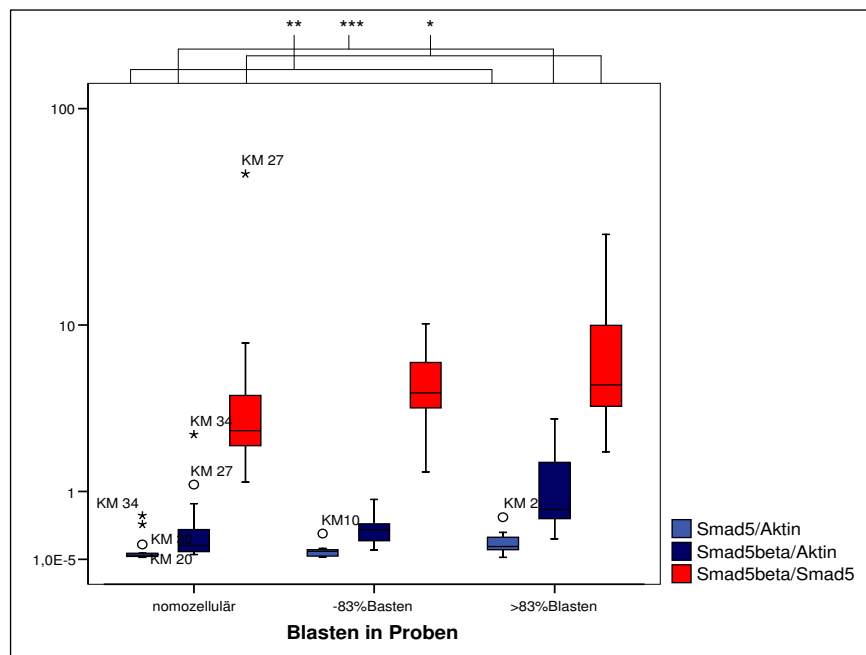


Abb. 32 Boxplots der Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  bezogen auf  $\beta$ -Aktin bzw. Smad5 $\beta$ /Smad5 in Abhängigkeit von den Blasten im Knochenmark, \*  $<0,1$  \*\*  $p<0,05$  \*\*\*  $p<0,01$

Betrachtet man weiterhin die prognostisch wichtige Altersgrenze „60. Lebensjahr“, so ist die Expression von Smad5 bei Patienten, die jünger als 60 Jahre sind größer als bei denen die älter sind. Dieser Unterschied ist auf dem Signifikanzniveau von 10% relevant ( $p=0,055$ ). Auch die Expression von Smad5 $\beta$  ist bei den Patienten, die zum Zeitpunkt der Analyse das 60.Lebensjahr noch nicht erreicht haben, größer. Dieser Unterschied ist mit  $p=0,032$  statistisch signifikant (Abb. 34). Übereinstimmend korreliert für beide Transmitter die Expression tendenziell oder signifikant negativ mit dem Alter der Patienten bei Diagnosestellung (Smad5:  $r=-0,336$ ;  $p=0,052$ ; Smad5 $\beta$ :  $r=-0,373$ ;  $p=0,03$ , Korrelation nach Spearman).

Auch bezogen auf die Leukozytenzahl im peripheren Blut ließen sich signifikante Unterschiede im Globaltest nachweisen, die sich auch in Untergruppen wieder fanden. So lag der Median des Quotienten Smad5 $\beta$ /Aktin der Gruppe mit einer Leukozytenkonzentration von 4,4 bis 11,3 Gpt/l mit 0,149 (0,077-0,630) deutlich unter dem der Patientenproben mit Leukozyten über 11,3Gpt/l (Median 0,614; 0,050-3,217) und ist damit statistisch signifikant verschieden ( $p<0,05$ ).

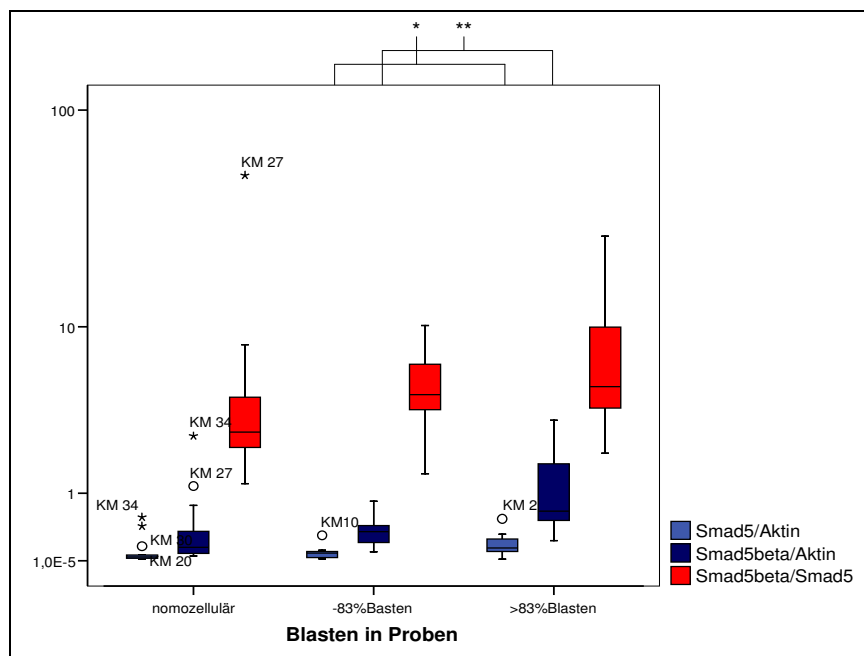


Abb.33 Boxplots der Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  bezogen auf  $\beta$ -Aktin bzw. Smad5 $\beta$ /Smad5 aus Real-Time-PCR in Abhängigkeit von den Blasten im Knochenmark, \*  $<0,1$  \*\*  $p<0,05$

## Ergebnisse

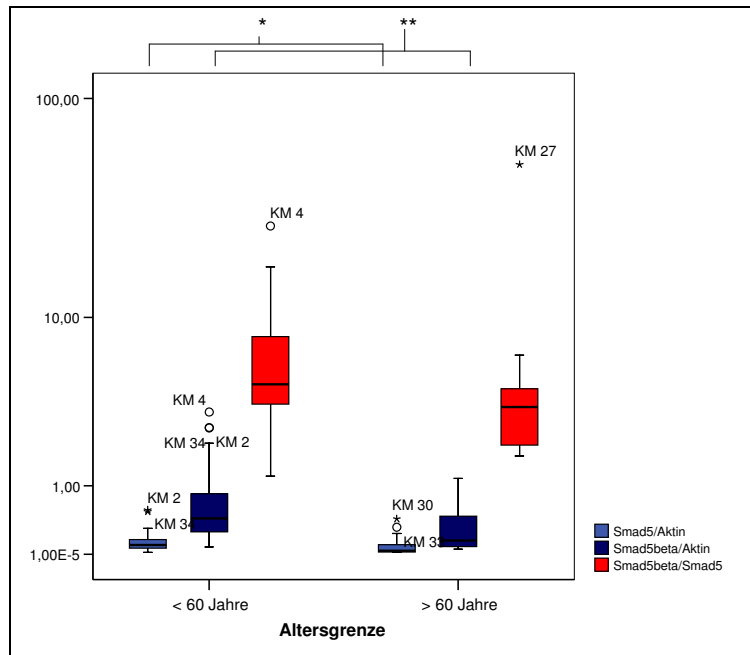


Abb. 34 Boxplots der Expression von Smad5 und Smad5β bezogen auf β-Aktin bzw. Smad5β/Smad5 aus Real-Time-PCR in Abhängigkeit von der Altergrenze 60. Lebensjahr, \* $<0,1$ , \*\* $p<0,05$

Auch im Vergleich mit den Maßzahlen des Kollektives mit Leukozytenkonzentrationen über 100Gpt/l (Median 2,080; 1,367-2,607) besteht für die erstgenannte Gruppe ein Unterschied mit statistischer Signifikanz ( $p<0,05$ ). Im Vergleich dieser beiden Gruppen findet sich ebenfalls für die Expression von Smad5 sowie für den Quotienten von Smad5β zu Smad5 ein statistisch signifikanter Unterschied auf Zehn-Prozent-Ebene. Die ermittelten Werte in der Normbereichsgruppe sind jeweils nur halb bis ein Drittel so groß (Abb. 35).

Letztlich fällt in der Globalanalyse noch ein statistisch signifikanter Unterschied der Expression von Smad5β in Zusammenhang mit der Konzentration der Thrombozyten im peripheren Blut auf (Abb.36). Mit einem Median von 0,648 (0,146-3,217) ist die mittlere Konzentration von Smad5β bei einer deutlich erniedrigten Konzentration von Blutplättchen im peripheren Blut von unter 30Gpt/l gerade doppelt so groß wie in der Gruppe mit einer Thrombozytenkonzentration von 30-150Gpt/l (Median 0,380; 0,050-2,589). Der ermittelte Unterschied ist auf dem Niveau von fünf Prozent für  $\alpha$  signifikant ( $p=0,021$ ). Auch für den Quotienten aus Smad5β und Smad5 kann ein signifikanter Unterschied ermittelt werden ( $p=0,05$ ). Auch hier sind in der Gruppe mit stark erniedrigten Thrombozytenkonzentrationen die ermittelten Werte höher als in der Gruppe mit mittelschwer bis gering erniedrigten Werten (Median 5,606 vs. 3,705).

## Ergebnisse

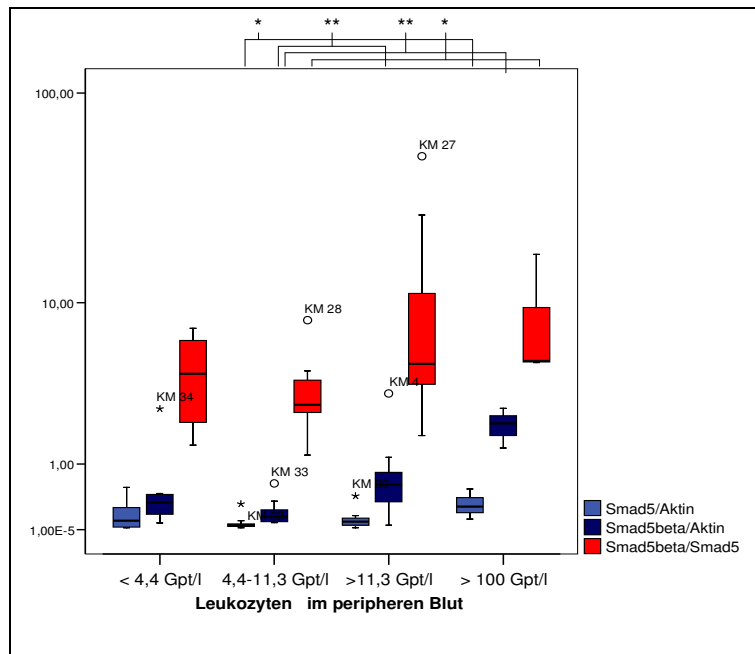


Abb. 35 Boxplots der Expression von Smad5 und Smad5β bezogen auf β-Aktin bzw. Smad5β/Smad5 bezogen auf die Konzentration der Leukozyten im peripheren Blut zum Zeitpunkt der Knochenmarkspunktion, \*\*  $p < 0,05$ , \*  $p < 0,1$

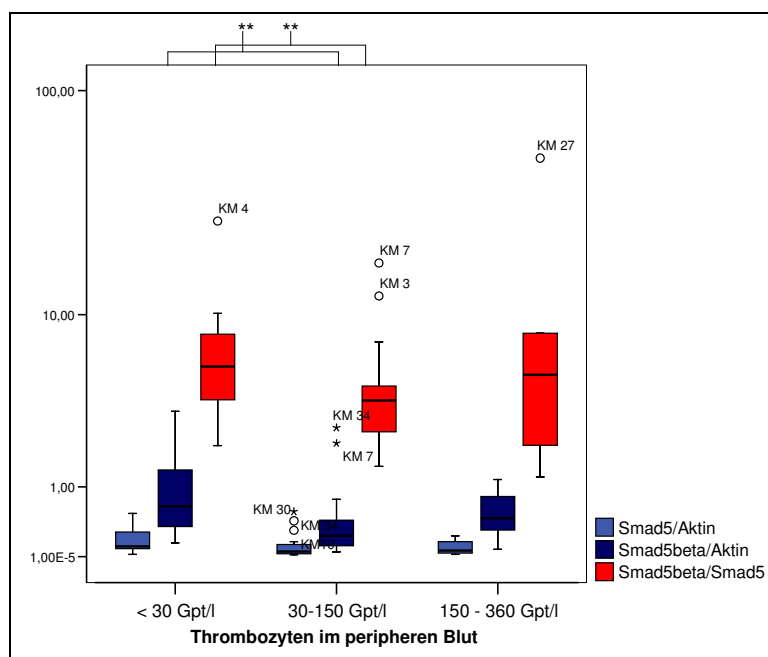


Abb. 36 Boxplots der Expression von Smad5 und Smad5β bezogen auf β-Aktin bzw. Smad5β/Smad5 bezogen auf die Konzentration der Thrombozyten im peripheren Blut zum Zeitpunkt der Knochenmarkspunktion, \*\*  $p \leq 0,05$

Neben den beschriebenen Unterschieden der untersuchten Expressionen in Bezug auf die klinischen Parameter finden sich weiterhin signifikante Korrelationen mit dem Alter bei Erstdiagnose für Smad5 ( $r = -0,355$ ;  $p=0,039$ ) sowie für Smad5 $\beta$  ( $r = -0,311$ ;  $p=0,073$ ; jeweils Methode nach Spearman). Auch für die Anzahl der Blasten im Knochenmark, angegeben in Prozent, lassen sich signifikante Korrelationen (nach Spearman) zu den untersuchten mRNA-Varianten finden. Mit diesem Parameter korreliert die Expression von Smad5 $\beta$  stark ( $r=0,478$ ;  $p=0,004$ ). Die Expression von Smad5 und der Quotient Smad5 $\beta$ /Smad5 zeigen mittlere Korrelationen mit diesem Parameter ( $r= 0,333$ ;  $p=0,054$  bzw.  $r=0,334$ ;  $p=0,053$ ). Beides verstärkt die oben bereits genannten Unterschiede der Expressionen in Abhängigkeit von der Blastenzahl bzw. dem Alter bei Erstdiagnose. Darüber hinaus konnte ein Zusammenhang der Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  mit der Konzentration von CD13 $^{+}$ -Zellen ermittelt werden, der für Smad5 mit  $r = 0,455$  ( $p=0,033$ ) bzw. für Smad5 $\beta$  mit  $r = 0,456$  ( $p=0,033$ ) gleich stark ist.

## 5. Diskussion

In einer konzertanten Aktion werden während der Hämatopoese aus pluripotenten, sich selbsterhaltenden Stammzellen myeloische und lymphatische Vorläuferzellen gebildet, die sich dann in Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten sowie Lymphozyten weiter differenzieren. Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Hormonen sind daran beteiligt. Diese Vielfältigkeit der beteiligten Stoffe und ausgelösten Prozesse auf molekularer und zellulärer Ebene machen das Verständnis der Zusammenhänge schwierig.

Eine wichtige Rolle haben Vertreter der TGF $\beta$ -Superfamilie, zum Beispiel die Transformierenden Wachstumsfaktoren  $\beta$  und das BMP4. Allerdings sind die durch diese Substanzen regulierten Signalübermittlungswege ebenso zahlreich. Es existieren Smad-abhängige und Smad-unabhängige Signalwege, die teils gleichsinnig, teils gegensinnig wirken. Smad5 ist ein Signaltransduktionsmolekül, für das sowohl eine Rolle im BMP- als auch im TGF $\beta$ -Signalweg diskutiert wird (Bruno et al. 1998, Chang et al. 1999, Li et al. 2001, Liu et al. 2003, Hariharan, Pillai 2006). Ebenso werden Smad5 als Übertragungsmolekül Rollen sowohl bei der embryonalen als auch bei der adulten Hämatopoese zugeschrieben (Yang et al. 1999, Liu et al. 2003, Bruno et al. 1998, Fuchs et al. 2002, Lenox et al. 2005). Auf letztere wird der Einfluss von Smad5 anhand aktueller Ergebnisse allerdings kontrovers diskutiert (Singbrant et al. 2006). Auch ist die Kontrolle der Smad5-vermittelten Signalübertragung noch nicht genau verstanden. Sie wird durch die Beschreibung eines gegensinnigen Transkriptes, genannt DMAS, noch weiter kompliziert (Zavadil et al. 1999).

Jiang und Mitarbeiter (2000) beschrieben darüber hinaus eine alternative Spleißvariante des Smad5, das Smad5 $\beta$ . Dieses Transkript kodiert eine verkürzte Proteinvariante und wurde in verschiedenen Tumorzellen, in Zellen des peripheren Blutes sowie in CD34<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen. Es bildet weder mit Smad5 noch mit Smad4 Oligomere (Jiang et al. 2000). Fuchs und Kollegen konnten diese mRNA-Variante in einer weiteren Arbeit zwar auch nachweisen, fanden aber keine schlüssigen Expressionsmuster vor (Fuchs et al. 2002). In dieser Arbeit sollte nun die Expression von Smad5

und Smad5 $\beta$  in unterschiedlichen Proben bestimmt werden. Bei Patientenproben wurde der Zusammenhang zwischen der Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  mit klinischen Parametern geprüft. Wir erhofften uns daraus ein weitergehendes Verständnis der Smad5 $\beta$ -Expression und damit Hinweise auf dessen Funktion. Mittelbar könnten sich außerdem das Verständnis der Smad5-Signalübertragung sowie seiner Rolle in der Hämatopoese weiter vertiefen.

Wir konnten in unseren Untersuchungen die Smad5 $\beta$ -mRNA durchgehend in dem von uns untersuchten Probenmaterial nachweisen. Dabei war die Expression der alternativen Spleißvariante in den untersuchten Zelllinien hämatopoetischer Erkrankungen überwiegend geringer als die Smad5-Expression. Einige Zelllinien z.B. die AML-Zelllinie MOLM13 zeigte aber ein umgekehrtes Verhältnis, Smad5 $\beta$  war in größerer Konzentration nachweisbar als Smad5. Wiederum andere zeigten uneinheitliche Expressionen mit hoher Varianz. Jiang et al. konnten ebenfalls am Beispiel der Erythroleukämiezelllinien TF1 und Hel jeweils gegensinnige stöchiometrische Muster nachweisen. Während die Zelllinie TF1 eher mehr Smad5 $\beta$  als Smad5 exprimierte, wurde in der Zelllinie Hel deutlich weniger Smad5 $\beta$  als Smad5 nachgewiesen (Jiang et al. 2000). Das von Jiang und Kollegen gezeigte Expressionsmuster der Zelllinie Hel wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Auch Fuchs und andere haben in den verwendeten Zelllinien Hel, HL60, K562 sowie Jurkat beide Transkripte nachweisen können. Eine quantitative Bestimmung ist allerdings nicht erfolgt (Fuchs et al. 2002). Der Einfluss der Kulturbedingungen auf die Expression wurde in keiner der beiden Arbeiten untersucht.

An drei ausgewählten Zelllinien wurde nachfolgend in dieser Studie der Einfluss der Kulturbedingungen, d.h. Dauer der Kultur und Konzentration des fetalen Kälberserums im Nährmedium, auf die Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  untersucht. Die Auswahl der Zelllinien erfolgte nach Erkrankungsart (AML- vs. Lymphomzelllinie) und Expressionsmuster. Auch wurden jeweils einfach zu kultivierende Linien gewählt. Hierbei konnten für die Zelllinien U937 und Hel eine numerische Zunahme der Expression beider Transkripte, besonders aber Smad5 $\beta$ , über die Kulturdauer gefunden werden (Abb. 12 und 13). Es besteht keine statistische Signifikanz. MOLM 13 zeigte jedoch statistisch gesicherte Unterschiede sowohl in Abhängigkeit von der Kulturdauer als auch von der Nährmediumkonzentration. Die Expression der beiden Prote-



invarianten nimmt mit zunehmender Dauer in den gewählten Konzentrationsstufen des Nährmediums, aber auch innerhalb einer gewählten Zeiteinheit in Abhängigkeit von der gewählten Serumkonzentration, und damit der zur Verfügung stehenden Nährstoffe, zu. Dabei steigt die Smad5 $\beta$ -Expression mit zunehmender Kulturdauer und Serumkonzentration von zunächst geringerer Konzentration als Smad5 bis zum Überwiegen an. Der Einfluss der steigenden Zellzahl ist durch die Normierung der gefundenen Konzentrationen auf die Konzentration des House-keeping-Genes  $\beta$ -Aktin herausgerechnet und durch den steten Einsatz von 1  $\mu$ g RNA weiter gemindert. Beide Smad5-Varianten unterliegen daher in der Zelllinie MOLM13 im Vergleich zu „Hungerbedingungen“ zunehmender Nährmediumkonzentration aber auch in Abhängigkeit von der Zeit einer statistisch gesicherten Stimulation der Expression durch die im fetalen Kälberserum enthaltenen Faktoren, wobei die Expression von Smad5 $\beta$  stärker zunimmt als die von Smad5 (Abb. 9-11).

In den Proben aus dem peripheren Blut sowie aus dem Knochenmark finden sich überwiegend höhere Transkriptmengen der Spleißvariante Smad5 $\beta$  als von Smad5, unabhängig ob die Probe von einem gesunden Probanden oder von einem an einer AML erkrankten Patienten stammt. Dabei konnte mit der Ausnahme der von Dr. S. Scholl, Klinik für Innere Medizin II, zur Verfügung gestellten KM-Proben jeweils eine mittlere bis starke statistisch relevante Korrelation der Expression beider Spleißvarianten von Smad5 gefunden werden. Dieser Befund steht im Gegensatz zu der bereits angeführten Untersuchung von Fuchs und Mitarbeitern (Fuchs et al. 2002), die beide Isoformen zwar in Zelllinien, CD34<sup>+</sup>-Zellen gesunder und an verschiedenen hämatologischen Erkrankungen leidender Probanden nachgewiesen haben, aber kein schlüssiges Expressionsmuster finden konnten.

Zur Analyse des peripheren Blutes gesunder Probanden standen Proben zur Verfügung, die nach kurzer Lagerzeit (30 Minuten bis max. 12 Stunden) direkt der Leukozytenisolation und anschließend der RNA-Lyse zugeführt worden sind und erst dann entsprechen gelagert wurden und solche aus der Leukozyten- und Serumbank des onkologischen Forschungslabors, die nach Leukozytenabtrennung eingefroren und bei -80 °C gelagert wurden. Es fiel auf, dass sich die Konzentration von Smad5 in beiden Gruppen signifikant unterscheidet. In letzterer wird Smad5 bei gleichen Minima beider Gruppen statistisch relevant weniger exprimiert als in der ersten Gruppe.

Für Smad5 $\beta$  ergibt sich numerisch eine höhere Expression, ohne dass der Unterschied statistisch signifikant ist. Dadurch kommt es zu einer schwach-signifikanten Verschiebung des Quotienten aus Smad5 $\beta$  und Smad5. Ein gleiches Bild ergibt sich bei einem statistischen Vergleich der frisch entnommenen Knochenmarksproben bei Diagnosestellung mit denen der durch Dr. S. Scholl, Klinik für Innere Medizin II, zur Verfügung gestellten Proben, die überwiegend vor der RNA-Aufbereitung als Zellpellet eingefroren worden sind. Während sich die Minima der Smad5-Werte ähneln, gibt es starke Abweichungen in den weiteren Lagemaßen, die statistisch hoch signifikant sind ( $p < 0,001$ ). Für die bestimmten Smad5 $\beta$ -Expressionen gibt es keine statistisch relevanten Abweichungen. Der gebildete Quotient aus Smad5 $\beta$  und Smad5 ist aber wieder signifikant verschieden.

Einfrieren eines Zellpellets bei  $-80^{\circ}\text{C}$  ist eine gängige, in der Literatur empfohlene Methode Zellen und deren RNA bis zur Analyse aufzubewahren. Breit und Mitarbeiter haben in einer Studie dargelegt, dass das sofortige Einfrieren von Knochenmarksproben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  nach Ficoll oder Erythrozytenlyse nicht zu detektierbaren Veränderungen in der mRNA-Expression führt. Allerdings führen der Transport und die Lagerung der Proben bei Raumtemperatur vor Aufarbeitung schon ab einer Dauer von drei Stunden zu dramatischen Veränderungen in der Genexpression. Bei den getesteten Genen zeigten nur 8,5% der Transkripte unter der Lagerung bei Raumtemperatur anhaltend stabile Expressionen. 40% der getesteten Gene zeigten unkonstante, starke Veränderungen ihrer Expression (Breit et al. 2004). Als möglicher Einflussfaktor muss dies sowohl für die Proben der Leukozyten- und Serumbank als auch die Proben von Scholl diskutiert werden und kann möglicherweise die Expressionen bzw. die Stabilität der Smad5-Transkripte dieser Proben bestimmt haben. Deren Aufarbeitung nach Abnahme entzog sich dem Autor. Einschränkend muss aber auch erwähnt werden, dass ein Teil der frisch bis zur RNA aufgearbeiteten Blut- und Knochenmarksproben bis 12 Stunden bei Raumtemperatur gelagert wurde, ehe die Aufbereitung erfolgte. Die Ergebnisse dieser Proben können daher dem gleichen systematischen Fehler unterliegen.

Für die Auftrennung der einzelnen Zellfraktionen aus frischen Proben peripheren Blutes nach zwei unterschiedlichen Methoden konnte ein Trend dahingehend beobachtet werden, dass in granulozytären Fraktionen mehr Smad5 $\beta$  als Smad5 und in mo-

nonukleären Fraktionen des peripheren Blutes mehr Smad5 als Smad5 $\beta$  exprimiert wird. Die ermittelten Unterschiede waren in der Globaltestung statistisch signifikant, konnten aber in der Einzeltestung aufgrund des geringen Stichprobenumfangs (n=7) nicht auf einzelne Gruppen festgelegt werden.

Für die vollständig differenzierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes stimmt der Befund mit den Ergebnissen von Jiang und Mitarbeitern überein, die in solchen Zellen ebenfalls geringere Mengen der Smad5 $\beta$ -mRNA als der Smad5-mRNA gefunden haben (Jiang et al. 2000). Die Zellen der granulozytären Reihe wurden dabei nicht untersucht. Für die mononukleäre Zellfraktion des peripheren Blutes sind in der Literatur weitere Expressionsstudien im Rahmen anderer Fragestellungen zu finden, die Moleküle des BMP/TGF $\beta$ -Signalweges untersuchen. Hierbei konnten zum Beispiel Aoki und Kollegen in einer Fall-Kontroll-Studie zur Primär Sklerosierenden Cholangitis (PSC) Smad5 in mononukleären Zellen des peripheren Blutes nachweisen, wobei sie bei den PSC-Erkrankten eine signifikant geringere Smad5-Expression fanden (Aoki et al. 2006). Martinovic et al. (Martinovic et al. 2004) konnten Smad5 zwar in Kulturen von Knochenmarksstromazellen nachweisen, nicht aber in Lymphozyten des peripheren Blutes. In beiden Studien wurden weder die Granulozyten noch die Expression von Smad5 $\beta$  untersucht.

Interessanterweise finden sich übereinstimmend zu den Expressionsbefunden in granulozytären Zellen in unseren weiteren Untersuchungen des peripheren Blutes an AML erkrankter Patienten schwache Korrelationen zwischen der Smad5 $\beta$ -Expression sowie dem Quotient von Smad5 $\beta$  zu Smad5 und der Anzahl der Neutrophilen Granulozyten. Darüber hinaus konnte in den frisch aufgearbeiteten KM-Proben ein Zusammenhang zwischen dem Marker der myelomonozytären Reihe CD13 und der Expression von Smad5 $\beta$  allerdings auch der Expression von Smad5 gefunden werden. In der Literatur ist bisher kein Zusammenhang zwischen Smad5 und der myelomonozytären Reihe und insbesondere der Granulozyten des peripheren Blutes beschrieben worden. Allein für die Erythropoese konnten für Smad5 in Folge einer BMP4-Antwort eine Bedeutung gezeigt werden (Fuchs et al. 2002; Lenox et al. 2005). Die Frage, ob der gefundene Trend des Zusammenhanges zwischen der Expression insbesondere von Smad5 $\beta$  und der myelomonozytären bzw. granulozytären Reihe rein zufällig ist oder ob ein funktioneller Zusammenhang besteht, kann aus

diesen Daten nicht geklärt werden. Weitergehende Untersuchungen hierzu sind erforderlich.

Im Probengut aus dem peripheren Blut von AML-Patienten, das aus der Leukozyten- und Serumbank des Onkologischen Forschungslabors akquiriert worden ist, fallen insbesondere die Unterschiede in der Expression der untersuchten RNA-Varianten in Abhängigkeit von der die Probe zur Verfügung stellenden Station auf. So ist die Smad5 $\beta$ -Expression in den Proben der Knochenmarkstransplantationsstation größer als in denen der anderen beiden Stationen (Station 9 und Poliklinik) und in diesem Zusammenhang kommt es zu Unterschieden zwischen den Quotienten Smad5 $\beta$ /Smad5. Die eingeschlossenen Patienten der Knochenmarkstransplantationsstation 15 befinden sich zum Grossteil in partieller oder kompletter Remission und weisen überwiegend normale bis subnormale oder verminderte Leukozytenzahlen auf. Sie haben sich zum Zeitpunkt der Probenabnahme überwiegend (chemo-) therapeutischen Maßnahmen unterzogen oder unterziehen sich solchen. Zum Teil wurde sogar eine Knochenmarks- oder Stammzelltransplantation eingeleitet. Die Patientenproben der Station 9 wurden hingegen überwiegend bei Diagnosestellung abgenommen und weisen häufiger noch Blasten im peripheren Blut auf. Ein kleiner Teil dieser Proben entstammt aber ebenfalls Patienten, an denen schon therapeutische Maßnahmen erfolgten. Aus der Poliklinik stammen Proben, die sich sowohl in zum Teil länger anhaltender partieller oder kompletter Remission als auch im Rezidiv oder vor einer Therapie befinden. Ein Einfluss der begonnenen Therapieregime auf die Expression der beiden Smad5-Varianten ist somit möglich, kann aber aufgrund der Vielzahl der Verläufe statistisch nicht gesichert werden. In der weiteren Datenanalyse finden sich Hinweise darauf, dass die Expression beider Smads in leukopenischen Proben größer ist, als in Proben mit Leukozyten im Normbereich oder gar mit einer Leukozytose. Der fassbare Unterschied der Expression zwischen den Herkunftsstationen kann auch dadurch mitbedingt sein. Es finden sich im Gut der KMT überwiegend Patienten mit Leukozyten im Normbereich oder mit Leukozytopenie, infolge einer begonnenen (myeloablativen) Therapie. Unter den Patienten der anderen beiden Stationen sind Patienten sowohl mit Leukozytopenie als auch mit Leukozytose sowie mit Leukozyten im Normbereich zusammengefasst.

Darüber hinaus finden sich ebenfalls Expressionsunterschiede im Zusammenhang mit dem Alter der Patienten. Im Vergleich beider Gruppen wird Smad5 $\beta$  in der Gruppe der über 60-jährigen in tendenziell geringerer Konzentration gefunden, als in der Gruppe der unter 60-jährigen (Abb. 25). Der Quotient aus Smad5 $\beta$  und Smad5 bildet dies entsprechend ab, wobei der Unterschied hier schwach signifikant ist. In Übereinstimmung mit diesem Befund finden sich auch im eigenen Knochenmarksgut geringere Expressionen von Smad5 ( $p < 0,1$ ) und Smad5 $\beta$  ( $p < 0,05$ ) bei den Patienten, die das 60. Lebensjahr erreicht oder überschritten haben (Abb. 34). Die Altersgrenze 60. Lebensjahr wurde gesetzt, da bei Patienten, welche das 60. Lebensjahr überschritten haben, Therapieergebnisse hinsichtlich Remissionsrate, Remissionsdauer und Überlebenszeit schlechter sind als bei Patienten, welche jünger als 60 Jahre sind (Kern et al. 2003). Es handelt sich um einen etablierten Prognosefaktor. Hierfür werden neben klinischen Faktoren wie Komorbidität auch biologische Faktoren diskutiert. Darunter zählen die in dieser Altersgruppe häufigere sekundäre Genese der Erkrankung sowie vermehrt ungünstige zytogenetische Veränderungen, wie der (teilweise) Verlust der Chromosomen 5 und 7 oder komplex-chromosomale Abberationen (Kern et al. 2003). Für diese Untersuchung konnte aber ein statistisch relevanter Unterschied der Karyotypveränderungen in Abhängigkeit vom Alter nicht gefunden werden, da nicht für alle Patienten der Karyotyp des AML-Klons bekannt war (Daten nicht gezeigt). Unter den Patienten, bei denen eine Veränderungen im Karyotyp dokumentiert werden konnte - darunter befinden sich u.a. Deletionen des langen Armes von Chromosom 5, ist die Smad5 $\beta$ -Expression signifikant kleiner als in den Gruppen mit unverändertem oder unbekannten Karyotyp. Möglicherweise hat dieser Befund einen Einfluss auf die hier bestimmte, mit höherem Alter geringere Smad5 $\beta$ -Expression. Die Fallzahlen sind aber jeweils zu gering, um sichere Rückschlüsse auf einzelne chromosomale Veränderungen, insbesondere das Chromosom 5 betreffend, ziehen zu können. Weitere, größere Untersuchungen könnten klären, ob es eine altersabhängig relevante Veränderung der Smad5- und Smad5 $\beta$ -Expression, auch beim Gesunden, gibt und worauf diese zurückzuführen ist. Auch die Korrelation der Smad5 und Smad5 $\beta$ -Expression mit häufigen Karyotypveränderungen muss Studien mit größeren Patientenzahlen überlassen bleiben.

Die Möglichkeit, Probenmaterial aus einer großen, über Jahre hinweg geführten Leukozyten- und Serumbank zu akquirieren, stellte zu Beginn der Arbeit eine lohnende

Alternative zur eigenen, zeitaufwändigen Probenakquisition dar. Der potenzielle Stichprobenumfang war recht groß (zu Beginn der Arbeit auf über 70 Proben geschätzt) und für die Untersuchung einfach und günstig zu erhalten. Allerdings stellte sich in der weiteren Bearbeitung anhand der Auswertung der ribosomalen RNA heraus, dass die Probenqualität oft gering war, so dass von über 70 Proben letztlich nur 54 in die Auswertung einbezogen werden konnten (77%). Außerdem musste festgestellt werden, dass die Patienten, von denen Proben konserviert worden sind, oft nur sehr unsystematisch ausgewählt waren. Bedauerlicherweise finden sich daher nur relativ wenige Proben peripheren Blutes bei Diagnosestellung mit hoher Blastenlast. Auch sind nur sehr wenige Verlaufsproben von ein und demselben Patienten vorhanden, die wiederum für Expressionsuntersuchungen interessant gewesen wären. Zum Teil wurden auch Patienten einbezogen, die sich bei Probenabnahme einer Chemotherapie oder einer Stamm- bzw. Knochenmarkstransplantation unterzogen. Deren Einfluss auf die Expression beider Smad5-Varianten ist nicht bekannt und kann die Ergebnisse beeinflussen. Über viele Jahre aufgebaute Tumorprobenbanken stellen für die Forschung wichtige Probenquellen dar, mit deren Hilfe möglicherweise jahrelange, eigene Probensammlungen vermieden werden können. Insbesondere bei seltenen Tumorentitäten können sie eine große Unterstützung sein, ausreichend Probenmaterial zu erhalten. Wie aus dieser Untersuchung aber hervorgeht, ist es für die Qualität der Probenbank und der damit verbundenen Forschung entscheidend, dass das Material anhand standardisierter Kriterien zuverlässig gesammelt und die einzulagernden Proben rasch und fachgerecht transportiert und aufbereitet werden. Der Zeitfaktor ist dabei, wie oben ausgeführt, von großer Bedeutung. Dabei sind insbesondere die klinischen Stationen bzw. Institute über die Existenz der Probenbank zu informieren und klare Richtlinien zur Probenakquisition bekannt zu machen, um ausreichend Proben sammeln zu können.

In den eigenständig aufgearbeiteten, durch das Zellanalyselabor der Klinik für Innere Medizin II zur Verfügung gestellten Proben fällt zunächst der Unterschied zwischen der AML- und den gewählten Kontrollgruppen auf. Die Kontrollgruppen bestehen entweder aus Proben von Patienten, die an AML erkrankt sind und nach begonnener Therapie eine komplette Remission erreicht haben, oder von Patienten, die sich im Verdacht auf eine hämatologische Erkrankung einer Knochenmarkspunktion unterzogen haben, deren Knochenmark aber einen immunzytochemischen Normalbefund

aufweist. Während sich die beiden Kontrollgruppen nicht wesentlich in ihrem Expressionsbefund unterscheiden, finden sich sowohl für Smad5 als auch für Smad5 $\beta$  in der Patientengruppe bei Diagnosestellung höhere Transkriptmengen als bei den AML-Patienten in Remission ( $p$  jeweils  $< 0,05$ ). Der Quotient zueinander ist tendenziell, nicht aber statistisch signifikant in letzterer kleiner. In der „Nicht-AML“-Gruppe findet sich hingegen ein signifikant von der AML-Gruppe abweichender Quotient, während sich die Einzelwerte nur tendenziell voneinander abheben (Abb. 31). Sucht man nun in den Gruppen nach weiteren Differenzen, die die genannten Unterschiede erklären können, stößt man zunächst auf signifikante Abhängigkeiten der Expressionen beider Spleißvarianten von der Anzahl der in der Probe befindlichen Blasten (Abb. 32 und 33). Insbesondere bei starker bis subtotaler Blastendurchsetzung sind beide mRNA-Varianten in größeren Transkriptmengen vorhanden, als bei normozellulärem Knochenmark oder solchem mit erhöhter Blastenmenge. Für die Smad5 $\beta$ -mRNA ist der Unterschied hoch-signifikant. Analog hierzu finden sich hoch-signifikante, mittlere Korrelationen zwischen der Expression von Smad5 $\beta$  und der Anzahl der Blasten ( $r=0,478$   $p=0,004$ ; Korrelation nach Spearman) sowie schwach-signifikante, mittlere Zusammenhänge zwischen der Expression von Smad5 ( $r=0,333$ ;  $p=0,054$ ) und letztlich auch dem Expressionsquotienten beider Spleißvarianten ( $r=0,334$ ;  $p=0,053$ ) und der Blastendurchsetzung des Knochenmarks. Auch findet sich eine mittlere Korrelation zwischen beiden Transkriptvarianten mit der Anzahl der CD13 $^{+}$ -Zellen im Knochenmark, die statistisch relevant ist (jeweils  $r=0,455$ ;  $p=0,033$ , Korrelation nach Spearman). Ein Zusammenhang mit frühen Zellmarkern wie CD33 $^{+}$ - oder CD34 $^{+}$ -Zellen lässt sich allerdings nicht nachweisen. Weiterhin finden sich relevante Unterschiede in der Expression vor allem von Smad5 $\beta$  in Abhängigkeit von der peripheren Leukozytenkonzentration und der Anzahl der Thrombozyten im peripheren Blut (Abb. 35 und 36). Die nachgewiesenen Konzentrationen von Smad5 $\beta$  sind jeweils bei pathologischem Befund, d.h. bei Leukozytose oder starker Leukozytose (Leukozyten über 11,3Gpt/l bzw. Leukozyten über 100Gpt/l) bzw. starker Thrombozytopenie (Blutplättchen im peripheren Blut von unter 30Gpt/l), deutlich erhöht. Tendenziell oder auf geringem statistisch signifikantem Niveau finden sich auch Veränderungen der Smad5-Expression in der gleichen Richtung.

Jiang und Kollegen konnten beide Varianten in einem Pool CD34 $^{+}$ -Zellen aus gesundem Knochenmark feststellen. Die Konzentration des Smad5 $\beta$ -Produktes war dabei

höher als die des vollständigen Smad5 (Jiang et al. 2000). Auch Fuchs und andere konnten in einer Arbeit beide Produkte in CD34<sup>+</sup>-Zellen sowohl von gesunden Probanden als auch von an MDS, AML und Non-Hodgkin-Lymphom erkrankten Patienten vor Chemotherapie nachweisen, wobei keine quantitative Bestimmung erfolgte (Fuchs et al. 2002). Die Synthese der Daten legt die Vermutung nahe, dass die Expression beider Transkriptvarianten sowohl in den Vorläuferzellen von gesunden Patienten als auch im malignen Stammzellklon von an AML-erkrankten Patienten in ähnlichen stöchiometrischen Verhältnissen vorhanden ist. Die Stärke der gemessenen Expression nimmt unserer Untersuchung zufolge mit der Blastenkonzentration und abnehmendem Einfluss anderer, höher differenzierter Zellen, wie sie in einem gesunden Knochenmark zu finden sind, zu. Im Unterschied zur Arbeitsgruppe von Jiang konnten wir aber keinen direkten Zusammenhang zwischen der Smad5 $\beta$ -Expression und der CD34<sup>+</sup>-Population herstellen. Es fand sich allerdings eine Korrelation mit CD13<sup>+</sup>-Zellen, Zellen der myelomonozytären Reihe.

Ähnliche Ergebnisse konnte abseits des TGF $\beta$ -Smad-Signalweges auch für den bei der AML pathogenetisch und prognostisch wichtigen FLT3-Rezeptor erhoben werden. Kuchenbauer et al. (2005) fanden für den FLT3-Rezeptor höhere Expressionen im Knochenmark von 207 an AML erkrankten Patienten als im Knochenmark von 8 gesunden Spendern. Sie konnten außerdem zeigen, dass sowohl die Anzahl der Blasten im Knochenmark als auch die Zahl der Leukozyten im peripheren Blut mit der Expressionsstärke des FLT3-Rezeptors korrelieren. Eine Korrelation mit dem Alter der Patienten oder der Zahl der Thrombozyten konnte hier allerdings nicht gefunden werden. Ebenfalls konnten sie für die FLT3-Expression keinen Zusammenhang mit der CD34-Expression herstellen (Kuchenbauer et al. 2005).

Direkte Vergleichsstudien der quantitativen Expression beider Produkte in Vorläuferzellen der Hämatopoese von gesunden Probanden sowie an AML-erkrankter Patienten stehen aus. Diese können klären, ob die gefundenen Expressionsmuster im Zusammenhang mit dem pathologischen Stammzellklon stehen oder Ausdruck normaler Zellfunktion sind. Denkbar ist, dass eine Zunahme der Expression von Smad5 $\beta$  über ein bestimmtes Maß hinaus, die antiproliferative, differenzierungsfördernde Wirkung des Smad5-Weges als kompetitiver Inhibitor unterdrückt. Eine Rolle als weiterer



negativer Regulationsmechanismus zur Feinregulation des TGF $\beta$ /BMP-Signalweges ist denkbar.

Angelehnt an die Originalarbeit von Jiang et al. 2000 haben wir den dort verwandten Smad5 $\beta$ -Primer genutzt. Allerdings ist dieser Primer kein Intron-übergreifender Primer. Intron-übergreifende Primer gelten für Expressionsstudien als Goldstandard, da durch sie eine Verunreinigung der RNA durch DNA ohne Einfluss auf das Ergebnis bleibt. Ein DNA-PCR-Produkt ist mit diesen Primer größer als das gesuchte RNA-Transkript und hebt sich dadurch eindeutig von den gewünschten Produkten ab. Generell wird zwar durch den Hersteller des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) die weitgehende Elimination von genomischer DNA durch die Methode postuliert, allerdings können noch kleinste Mengen im Präparat zurückbleiben und sehr sensitive Testmethoden beeinflussen (RNeasy Mini Handbook 2006, Qiagen, Hilden). Daher muss für unsere Untersuchung kritisch angemerkt werden, dass sich durch die Verwendung des Originalprimers ein möglicher systematischer Fehler ergeben kann, der bei Verunreinigung der RNA durch DNA zu einer Überschätzung der tatsächlichen Transkription führt. Für weitergehende Untersuchungen sollte daher von der Verwendung des durch Jiang eingeführten Primers abgesehen und ein Intron-übergreifender Primer, wie der im Folgenden vorgeschlagene, verwendet werden (Tab. 12).

Primer	Sequenz	Annealingtemperatur in °C
Smad5 $\beta$ /1	ATACGCCTCCTCCTGCCTAT	60.08
Smad5 $\beta$ /2	ATACAATTCTTCAATATCGGCAACT	58.2

Tab. 12 Alternativ vorgeschlagener Smad5 $\beta$ -Primer

Darüber hinaus muss kritisch bemerkt werden, dass ein Nachweis des Proteins in dieser Untersuchung nicht erfolgte. Dieser sollte zur Einordnung der genannten Ergebnisse in weitergehenden Untersuchungen erfolgen, da bekannt ist, dass die Expression auf mRNA-Ebenen nicht gleich zu setzen ist mit der Translationsebene. Dazwischen stehen vielerlei Schritte posttranskriptioneller und posttranslationeller Regulation, die Veränderungen in Bezug auf die mRNA-Stabilität, Modifizierungen der Translationsrate eines Proteins, seiner Halbwertszeit oder seiner Sekretion umfassen.

## 6. Schlussfolgerung

In dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die alternative Spleißvariante des Smad5 Smad5 $\beta$  nicht nur in verschiedenen Tumorzelllinien, sondern auch durchgehend in Zellen des Knochenmarkes und des peripheren Blutes nachweisbar ist. Mit Ausnahme der mononukleären Zellen des peripheren Blutes und einiger Zelllinien wird das alternative Transkript konstant stärker exprimiert als Smad5. Im Knochenmark besteht ein Zusammenhang der Stärke der Smad5 $\beta$ -Expression mit einer Erkrankung an AML und der Anzahl der Blasten.

Im Anschluss an diese Untersuchung sollten die hier dargestellten Daten auf Proteinebene validiert werden. Vergleichende Untersuchungen zur Expression von Smad5 und Smad5 $\beta$  in CD34<sup>+</sup>-Zellen gesunder und an AML-erkrankter Probanden könnten speziell die Bedeutung für die Leukämogenese weiter klären. Auch Expressionsuntersuchungen am kolorektalen und hepatozellulären Karzinom, bei denen Smad5 überexprimiert gefunden wurde (Korchynskyi et al. 1999; Zimonjic et al. 2003), könnten zur Klärung der Bedeutung von Smad5 $\beta$  beitragen. Weiterhin sollten Studien zur Aufklärung der biologischen Funktion des alternativen Transkriptes zum Beispiel unter Verwendung der anti-sense-Technologie folgen. Hierbei erscheint insbesondere interessant, ob Smad5 $\beta$  neben Funktionen in der Hämatopoese und einer Bedeutung für die Leukämogenese auch Bedeutung für die Funktion der Zellen der granulozytären Reihe besitzt.

## Literaturverzeichnis

Akel S, Petrow-Sadowski C, Laughlin MJ, Ruscetti FW. 2003. Neutralization of autocrine transforming growth factor-beta in human cord blood CD34(+)CD38(-)Lin(-) cells promotes stem-cell-factor-mediated erythropoietin-independent early erythroid progenitor development and reduces terminal differentiation. *Stem cells*. 5(21): 557–567.

Aoki CA, Dawson K, Kenny TP, Gershwin ME, Bowlus CL. 2006. Gene expression by PBMC in primary sclerosing cholangitis: evidence for dysregulation of immune mediated genes. *Clinical & developmental immunology*. 2-4(13): 265–271.

Bhatia M, Bonnet D, Wu D, Murdoch B, Wrana J, Gallacher L, Dick JE. 1999. Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *The Journal of experimental medicine*. 7(189): 1139–1148.

Bosman EA, Lawson KA, Debruyne J, Beek L, Francis A, Schoonjans L et al. 2006: Smad5 determines murine amnion fate through the control of bone morphogenetic protein expression and signalling levels. *Development*. 17(133): 3399–3409.

Breit S, Nees M, Schaefer U, Pfoersich M, Hagemeier C, Muckenthaler M, Kulozik AE. 2004. Impact of pre-analytical handling on bone marrow mRNA gene expression. *British journal of haematology*. 2(126): 231–243.

Bruno E, Horrigan SK, van Den Berg D, Rozler E, Fitting PR, Moss ST et al. 1998. The Smad5 gene is involved in the intracellular signaling pathways that mediate the inhibitory effects of transforming growth factor-beta on human hematopoiesis. *Blood*. 6(91): 1917–1923.

Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*. 2(25): 169–193.

Chadwick K, Wang L, Li L, Menendez P, Murdoch B, Rouleau A, Bhatia M. 2003. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood*. 102: 906–915.

Chang H, Huylebroeck D, Verschueren K, Guo Q, Matzuk MM, Zwijsen A. 1999. Smad5 knockout mice die at mid-gestation due to multiple embryonic and extraembryonic defects. *Development*. 8(126): 1631–1642.

Chang H, Matzuk MM. 2001. Smad5 is required for mouse primordial germ cell development. *Mechanisms of development*. 1-2(109): 61–67.

Chang H, Zwijsen A, Vogel H, Huylebroeck D, Matzuk MM. 2000. Smad5 is essential for left-right asymmetry in mice. In: *Developmental biology*. 1(219): 71–78.

Dijke P ten, Hill CS. 2004. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends in biochemical sciences*. 5(29): 265–273.

Dijke P ten, Iwata KK, Thorikay M, Schwedes J, Stewart A, Pieler C. 1990 Molecular characterization of transforming growth factor type beta 3. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 593: 26–42.

Dubois CM, Ruscetti FW, Palaszynski EW, Falk LA, Oppenheim JJ, Keller JR. 1990 Transforming growth factor beta is a potent inhibitor of interleukin 1 (IL-1) receptor expression: proposed mechanism of inhibition of IL-1 action. *The Journal of experimental medicine*. 3(172): 737–744.

Dubois CM, Ruscetti FW, Stankova J, Keller JR. 1994. Transforming growth factor-beta regulates c-kit message stability and cell-surface protein expression in hematopoietic progenitors. *Blood*. 11(83): 3138–3145.

Fenaux P, Kelaidi C. 2006. Treatment of the 5q- syndrome. *Hematology*: 192–198.

Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. 2000a. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood*. 6(96): 2022–2036.

Fortunel N, Hatzfeld J, Aoustin L, Batard P, Ducos K, Monier MN et al. 2000b. Specific dose-response effects of TGF-beta1 on developmentally distinct hematopoietic stem/progenitor cells from human umbilical cord blood. *The hematology journal*. 2(1): 126–135.

Fuchs O, Simakova O, Klener P, Cmejlova J, Zivny J, Zavadil J, Stopka T. 2002. Inhibition of Smad5 in human hematopoietic progenitors blocks erythroid differentiation induced by BMP4. In: *Blood cells, molecules & diseases*. 2(28): 221–233.

Gemma A, Hagiwara K, Vincent F, Ke Y, Hancock AR, Nagashima M et al. 1998. hSmad5 gene, a human hSmad family member: its full length cDNA, genomic structure, promoter region and mutation analysis in human tumors. *Oncogene*. 7(16): 951–956.

Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. 2002. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *The EMBO journal*. 7(21): 1743–1753.

Hager-Theodorides AL, Outram SV, Shah DK, Sacedon R, Shrimpton RE, Vicente A et al. 2002. Bone morphogenetic protein 2/4 signaling regulates early thymocyte differentiation. *Journal of immunology*. 10(160): 5496–5504.

Hariharan R, Pillai MR. 2006. Homology modeling of the DNA-binding domain of human Smad5: a molecular model for inhibitor design. *Journal of molecular graphics & modelling*. 4(24): 271–277.

Hejlik DP, Kottickal LV, Liang H, Fairman J, Davis T, Janecki T et al. 1997. Localization of SMAD5 and its evaluation as a candidate myeloid tumor suppressor. *Cancer research*. 17(57): 3779–3783.

Ishida W, Hamamoto T, Kusanagi K, Yagi K, Kawabata M, Takehara K et al. 2000. Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor. *Characterization of bone*

morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. The Journal of biological chemistry. 9(275): 6075–6079.

Ishisaki A, Yamato K, Hashimoto S, Nakao A, Tamaki K, Nonaka K. et al. 1999. Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells. The Journal of biological chemistry. 19(274): 13637–13642.

Jakubowiak A, Pouponnot C, Berguido F, Frank R, Mao S, Massague J, Nimer SD. 2000. Inhibition of the transforming growth factor beta 1 signaling pathway by the AML1/ETO leukemia-associated fusion protein. The Journal of biological chemistry. 51(275): 40282–40287.

Jiang Y, Liang H, Guo W, Kottickal LV, Nagarajan L. 2000. Differential expression of a novel C-terminally truncated splice form of SMAD5 in hematopoietic stem cells and leukemia. Blood 12(95): 3945–3950.

Junker U, Knoefel B, Nuske K, Rebstock K, Steiner T, Wunderlich H. et al. 1996. Transforming growth factor beta 1 is significantly elevated in plasma of patients suffering from renal cell carcinoma. Cytokine 10(8): 794–798.

Kern W, Behre G, von Schilling C, Haferlach T, Adorf D, Jehn U, Waterhouse C, Brack N, Schnittger S, Petrides PE, Hiddemann W. 2003. Akute myeloische Leukämie (AML) beim Erwachsenen. In: Hiddemann W, Haferlach T (Hrsg.) 2003. Manual Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. München: Zuckschwerdt Verlag, 17-48.

Kim SJ, Letterio J. 2003. Transforming growth factor-beta signaling in normal and malignant hematopoiesis. Leukemia, 9(17): 1731–1737.

Korchynskyi O, ten Dijke P. 2002. Bone morphogenetic protein receptors and their nuclear effectors in bone formation. In: Vukicevic S und Sampath KT. Hrsg. Bone Morphogenetic Proteins. Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser Verlag, 31–60.

Korchynskyi O, Landstrom M, Stoika R, Funa K, Heldin CH, ten Dijke P., Souchelnytskyi S. 1999. Expression of Smad proteins in human colorectal cancer. *International journal of cancer*. 2(82): 197–202.

Krystal G, Lam V, Dragowska W, Takahashi C, Appel J, Gontier A et al. 1994. Transforming growth factor beta 1 is an inducer of erythroid differentiation. *The Journal of experimental medicine*. 3(180): 851–860.

Kuchenbauer F, Kern W, Schoch C, Kohlmann A, Hiddemann W, Haferlach T, Schnittger S. 2005. *Haematologica*. 90(12): 1617-1625.

Larsson J, Karlsson S. 2005. The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene*. 37(24): 5676–5692.

Lenox LE, Perry JM, Paulson RF. 2005. BMP4 and Madh5 regulate the erythroid response to acute anemia. *Blood* 7(105): 2741–2748.

Li W, Chen F, Nagarajan RP, Liu X, Chen Y. 2001. Characterization of the DNA-binding property of Smad5. *Biochemical and biophysical research communications*. 5(286): 1163–1169.

Lin HK, Bergmann S, Pandolfi PP. 2005. Deregulated TGF-beta signaling in leukemogenesis. *Oncogene*. 37(24): 5693–5700.

Liu B, Sun Y, Jiang F, Zhang S, Wu Y, Lan Y et al. 2003. Disruption of Smad5 gene leads to enhanced proliferation of high-proliferative potential precursors during embryonic hematopoiesis. *Blood*. 1(101) :124–133.

Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. 1999: Acute myeloid leukemia. In: *The New England journal of medicine*. 14(341): 1051–1062.

Martinovic S, Mazic S, Kisic V, Basic N, Jakic-Razumovic J, Borovecki F et al. 2004. Expression of bone morphogenetic proteins in stromal cells from human bone

marrow long-term culture. *The journal of histochemistry and cytochemistry*. 9(52): 1159–1167.

McNiece IK, Bertoncello I, Keller JR, Ruscetti FW, Hartley CA, Zsebo KM. 1992. Transforming growth factor beta inhibits the action of stem cell factor on mouse and human hematopoietic progenitors. *International journal of cell cloning*. 2(10): 80–86.

Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques*. 6(24): 954-8, 960, 962.

Pierelli L, Marone M, Bonanno G, Rutella S, Ritis D de, Mancuso S, Leone G, Scambia G. 2002. Transforming growth factor-b1 causes transcriptional activation of CD34 and preserves haematopoietic stem/progenitor cell activity. *British Journal of Haematology*. 118: 627–637.

Qiagen. 2006. RNeasy® Mini Handbook. 4.Aufl. [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

Ramsfjell V, Borge OJ, Cui L, Jacobsen SE. 1997. Thrombopoietin directly and potently stimulates multilineage growth and progenitor cell expansion from primitive (CD34+ CD38-) human bone marrow progenitor cells: distinct and key interactions with the ligands for c-kit and flt3, and inhibitory effects of TGF-beta and TNF-alpha. *Journal of immunology*. 11(158): 5169–5177.

Rasmussen R, Morrison T, Herrmann M, Wittwer C. 1998. Quantitative PCR by Continuous Fluorescence Monitoring of a Double Strand DNA Specific Binding Dye. *Biochemica*. 2: 8–11.

Riggins GJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Thiagalingam S. 1997. Frequency of Smad gene mutations in human cancers. *Cancer research*. 13(57): 2578–2580.

Sansilvestri P, Cardoso AA, Batard P, Panterne B, Hatzfeld A, Lim B et al. 1995. Early CD34<sup>high</sup> cells can be separated into KIT<sup>high</sup> cells in which transforming growth factor-beta (TGF-beta) downmodulates c-kit and KIT<sup>low</sup> cells in which anti-TGF-beta upmodulates c-kit. *Blood*. 5(86): 1729–1735.



Shi Y, Massague J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 6(113): 685–700.

Singbrant S, Moody JL, Blank U, Karlsson G, Umans L, Zwijsen A, Karlsson S. 2006. Smad5 is dispensable for adult murine hematopoiesis. *Blood*. 12(108): 3707–3712.

Van Ranst PC, Snoeck HW, Lardon F, Lenjou M, Nijs G, Weekx SF et al. 1996. TGF-beta and MIP-1 alpha exert their main inhibitory activity on very primitive CD34+2CD38- cells but show opposite effects on more mature CD34+CD38+ human hematopoietic progenitors. *Experimental haematology*. 13(24): 1509–1515.

Tumorzentrum München: <http://www.tumorregister-muenchen.de> (19.Juli 2007)

Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. 2002. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 7(100): 2292–2302.

Yang X, Castilla LH, Xu X, Li C, Gotay J, Weinstein M et al. 1999. Angiogenesis defects and mesenchymal apoptosis in mice lacking SMAD5. *Development*. 8(126): 1571–1580.

Yue J, Mulder KM. 2001 Transforming growth factor-beta signal transduction in epithelial cells. *Pharmacology & therapeutics*. 1(91): 1–34.

Zavadil J, Brezinova J, Svoboda P, Zemanova Z, Michalova K. 1997. Smad5, a tumor suppressor candidate at 5q31.1, is hemizygously lost and not mutated in the retained allele in human leukemia cell line HL60. *Leukemia*. 8(11): 1187–1192.

Zavadil J, Svoboda P, Liang H, Kottickal LV, Nagarajan L 1999. An antisense transcript to SMAD5 expressed in fetal and tumor tissues. *Biochemical and biophysical research communications*. 3(255): 668–672.

Zimonjic DB, Durkin ME, Keck-Waggoner CL, Park SW, Thorgeirsson SS, Popescu NC. 2003. SMAD5 gene expression, rearrangements, copy number, and

amplification at fragile site FRA5C in human hepatocellular carcinoma. *Neoplasia*. 5(5): 390–396.

## **Anhang**

### Lebenslauf

Name: Jan Waskowski

Geburtsdatum/

Geburtsort: 21.06.1979, Gera, Deutschland

Schule : 1986 – 1991

Alexander-Matrosow-Oberschule und  
Juri-A.-Gagarin-Oberschule, Gera

1991-1998

Friedrich-Schiller Gymnasium, Gera

1998 Abitur (1,1)

Zivildienst: September 1998 – September 1999

Ableistung des Zivildienstes im Pflegedienst der gemeinnützigen  
Klinik Dr. Erler GmbH, Nürnberg

Studium: Oktober 1999 – September 2006

Studium der Medizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

April 2001 – Juni 2006

Stipendiat der Friedrich-Naumann-Stiftung

August/September 2001

Erfolgreicher Abschluss der „Ärztlichen Vorprüfung“ (1,66)

Juni 2006

Abschluss der „Ärztlichen Prüfung“ (1,49)

## Anhang

Praktisches Jahr: April - August 2005

Chirurgie am Spital Frutigen, Spitäler fmi AG, PD Dr. D. Heim

August – Dezember 2005

Innere Medizin am Spital Interlaken, Spitäler fmi AG, Dr. H. Schaad

Dezember 2005 - März 2006

Gynäkologie und Geburtshilfe, Helios Klinikum Erfurt GmbH,  
Prof. Dr. U.B. Hoyme

Berufserfahrung: 01. Oktober 2006 – 30. September 2007

Assistenzarzt Chirurgie am Gemeindespital Riehen, Riehen BS,  
Schweiz, Dr.P.Nussberger

Seit 01. Oktober 2007

Assistenzarzt Innere Medizin am Kantonsspital Baden, Baden  
AG, Schweiz, Prof. Dr. H.J. Beer

Aktivitäten/

Mitgliedschaften: Seit 2003

Mitglied im Ärztlichen Beirat der UNI-MED Verlag AG, Bremen

Seit 2000

Mitglied in der Vereinigung „Internationale Ärzte für die  
Verhütung des Atomkrieges, Ärzte in sozialer Verantwortung  
e.V.“ (IPPNW)

Sommersemester 2001 bis 2003

Gründung und Organisation eines fallorientierten Seminars zur  
Medizinethik nach dem „Ulmer Modell“

Brugg, 30. August 2008

Jan Waskowski

## Danksagung

Vielen Dank!

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Klaus Höffken, für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas und die Möglichkeit am Onkologischen Forschungslabor die Promotion vorbereiten zu können.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. biol. hum. Joachim Clement, der mir während der gesamten Promotionszeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Dr. Sebastian Scholl und Frau Prof. Dr. Katharina Pachmann für die freundliche Überlassung von Probenmaterial und Patientendaten.

Dr. rer. nat. Manuela Schwalbe, Anja Waldau, Conny Jörke und allen Mitarbeitern des Onkologischen Labors der KIM II Jena, für die praktischen Unterweisungen und Hilfestellungen während meiner Labortätigkeit.

Ein Dank gilt der Friedrich-Naumann-Stiftung, die mich während meines Studiums ideell und materiell förderte und damit auch zu dieser Promotion beitrug.

Ein herzlicher Dank an meine Mutter Christine Seidel und ihren Mann Eberhard sowie meinen Schwiegereltern Elke und Bernd Gnauck für ihre stete Unterstützung und ihren Rat in allen Lebenslagen.

Dr. med.dent. Maja Gnauck für das kritische Lektorat des Manuskriptes.

Ein besonders liebevoller Dank bleibt für meine Frau Tanja Gnauck, für ihre Geduld mit mir und den steten Ansporn während mancher Trockenzeit.

## Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. rer. biol. hum. Joachim Clement,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Brugg, 30.August 2008

Jan Waskowski